N° d'ordre : 186

THÈSE

PRÉSENTÉE DEVANT

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR OBTENIR LE DIPLOME DE

DOCTEUR - INGÉNIEUR

PAR

Jean-Pierre DESMAZES

INGÉNIEUR E. N. S. C. B.

Etude de la fixation du Benzo (a) Pyrène sur l'Albumine de serum de Bœuf

---

Soutenue le 28 mai 1973, devant la Commission d'Examen :

MM. PACAULT, Membre correspondant de l'Institut, Professeur ..... *Président*

JOUSSOT-DUBIEN, Professeur.....
BOTHOREL, Professeur.....
BOVÉ, Professeur.....
Mme DAUDEL, Maître de Recherche (C.N.R.S.)..... } *Examinateurs*

— 1973 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549625_0030

N° d'ordre : 186

THÈSE

PRÉSENTÉE DEVANT

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR OBTENIR LE DIPLOME DE

DOCTEUR - INGÉNIEUR

PAR

Jean-Pierre DESMAZES

INGÉNIEUR E. N. S. C. B.

Etude de la fixation du Benzo (a) Pyrène sur l'Albumine de serum de Bœuf

---

Soutenue le 28 mai 1973, devant la Commission d'Examen :

MM.	PACAULT, Membre correspondant de l'Institut, Professeur	*Président*
	JOUSSOT-DUBIEN, Professeur.....	*Examinateurs*
	BOTHOREL, Professeur.....	
	BOVÉ, Professeur.....	
M^me^	DAUDEL, Maître de Recherche (C.N.R.S.).....	

— 1973 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ce travail a été effectué au Centre de Recherches Paul Pascal, dirigé par Monsieur le professeur PACAULT, auquel je suis heureux d'exprimer mon respectueux attachement.

Qu'il me soit permis d'adresser mes respectueux remerciements à Monsieur le professeur BOTHOREL qui dirigea ce travail et ne cessa de me faire bénéficier de ses avis toujours sûrs ainsi que de sa présence amicale et encourageante me permettant de travailler dans des conditions idéales.

Je ne saurais oublier d'adresser mes plus vifs remerciements à Monsieur LUSSAN pour les avis précieux qu'il nous apporta lors de cette étude ; je remercie tout particulièrement son collaborateur, Monsieur BERNON, ingénieur au C.N.R.S., de m'avoir initié à des techniques nouvelles.

Je remercie Madame DAUDEL , maître de recherche au C.N.R.S., et messieurs les professeurs BOVE et JOUSSOT-DUBIEN d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous ne disposions pas de toutes les techniques souhaitées quand débuta notre étude. Nous fûmes conduits à utiliser les appareils existant dans les autres laboratoires bordelais. Ce ne fut évidemment possible que grâce à l'extrême obligeance des responsables de ces laboratoires et de leurs collaborateurs : messieurs les professeurs BOVE, JOUSSOT-DUBIEN, PAUTRIZEL, BLANQUET, BARAUD, CREAC'H, NEUZIL, messieurs DUPONT, EWALD, CAPBERN, LAPARRAT, CASSAGNE, DUCASTAING et madame JANSEN.

Je voudrais enfin remercier messieurs BRAUD et LE GRIVES ainsi que madame FAVEDE qui furent associés à certaines étapes de cette étude, les services techniques du Centre de Recherches Paul Pascal, madame GODEFROY pour la décontamination du matériel radioactif utilisé, ainsi que madame CAZAUX et monsieur MOINEAU qui ont contribué à la réalisation technique de ce mémoire.

ETUDE DE LA FIXATION DU BENZO (a) PYRENE SUR L'ALBUMINE DE SERUM DE BOEUF

INTRODUCTION

Pendant longtemps, deux théories moléculaires de la cancérogénèse chimique se sont opposées :

- l'une situe l'acte primaire du cancérogène ou d'un métabolite sur un acide nucléique,
- l'autre, sur une protéine.

Les études récentes de cellules cancéreuses à déviation minimale et de cellules transformées en culture ont fait réenvisager ces deux hypothèses sous un jour nouveau. Dans les cellules transformées ou malignes, les membranes cellulaires sont profondément modifiées (1). C'est même la propriété primordiale qui les distingue des cellules normales (inhibition de contact). Certains auteurs (2), s'appuyant sur cette observation, ont crû pouvoir situer l'acte primaire de la cancérogénèse sur ces membranes. Une étude récente d'Heidelberger (3) montrerait qu'un hydrocarbure cancérogène est métabolisé par une enzyme fixée fortement sur la membrane du reticulum endoplasmique. L'interaction de l'hydrocarbure avec la cellule se ferait donc tout d'abord avec une protéine, un métabolite pouvant éventuellement agir par la suite sur un acide nucléique.

Il est donc important de connaître le mécanisme d'interaction d'un hydrocarbure polycyclique cancérogène sur une protéine, d'analyser les sites et les taux de fixation. C'est ce que nous avons tenté de faire en utilisant des milieux modèles simples.

Nous avons préparé des solutions aqueuses de protéines en milieu tamponné de force ionique contrôlée, et nous avons fixé un hydrocarbure polycyclique cancérogène, le benzo (a) pyrène, sur cette protéine. Nous avons

ensuite étudié l'environnement de l'hydrocarbure dans la protéine et les modifications éventuelles de la structure tertiaire de cette dernière, à l'aide de diverses techniques physiques ou biochimiques.

Grâce à une méthode originale d'introduction de l'hydrocarbure dans la protéine, nous avons obtenu des taux de fixation très importants et pu étudier ainsi aisément les deux partenaires en interaction.

Cette méthode a été mise au point avec le couple albumine de sérum de boeuf - benzo (a) pyrène, puis étendue à d'autres protéines.

C'est pourquoi, nous présenterons principalement dans ce mémoire les résultats obtenus avec ces deux composés, en suivant le plan ci-après :

INTRODUCTION

I - RECHERCHE D'UNE METHODE DE FIXATION DE L'HYDROCARBURE POLYCYCLIQUE DANS LA PROTEINE

I-1) Travaux antérieurs

I-2) Une nouvelle méthode de fixation

I-3) Justification biologique d'un intermédiaire organique

II - PREPARATION DES SOLUTIONS AQUEUSES DU COMPLEXE HYDROCARBURE-PROTEINE

II-1) Nature des constituants

II-2) Protocole expérimental

II-2-1) La solution initiale

II-2-2) Fixation de l'hydrocarbure

II-2-3) Elimination de l'hydrocarbure en excès

II-3) Dosage des constituants

II-3-1) Dosage de l'hydrocarbure

II-3-2) Dosage de la protéine

III - RESULTATS EXPERIMENTAUX

III-1) Variation du taux de fixation

III-2) Contrôle de la structure de la protéine

III-2-1) Filtration sur gel

III-2-2) Viscosité

III-2-3) Ultracentrifugation analytique

III-2-4) Electrophorèse

III-2-5) Immunodiffusion et immunoélectrophorèse

III-2-6) Dispersion optique rotatoire (O.R.D.)

III-3) Contrôle de la fixation de l'hydrocarbure sur la protéine

III-4) Contrôle du marquage radioactif

III-5) Contrôle de l'action du chloro-2 éthanol

III-6) Elimination du toluène

IV - PROPRIETES SPECTRALES DE L'HYDROCARBURE FIXE DANS LA PROTEINE (BP - B S A)

IV-1) Les spectres d'absorption dans l'ultra-violet

IV-2) Les spectres de fluorescence

CONCLUSION

RECHERCHE D'UNE METHODE EXPERIMENTALE PERMETTANT LA FIXATION DE L'HYDROCARBURE POLYCYCLIQUE DANS LA PROTEINE

I-1) La méthode de simple mise en contact

Mis en présence d'une protéine, en milieu aqueux, un hydrocarbure polycyclique, tel que le benzo (a) pyrène ne se fixe pratiquement pas.

Avec G. Braud, dans notre laboratoire, nous avons confirmé ce résultat connu en réalisant l'expérience suivante :

Un volume donné d'une solution concentrée de benzo (a) pyrène dans le toluène (50 µl) est introduit dans une solution aqueuse tamponnée d'albumine de sérum de boeuf (BSA), (pH = 7, 8 ; force ionique 0, 145 M NaCl).

Le mélange est agité à 4°C sous atmosphère d'azote, pendant 16 jours. La solution est alors filtrée sur gel de sépharose 4 B qui élimine le benzo (a) pyrène non fixé à la protéine. Le spectre d'absorption ultra-violet, enregistré avec la plus grande sensibilité du spectromètre Cary 16, ne décèle aucune présence d'hydrocarbure polycyclique.

Cette difficulté est liée en partie à la très faible solubilité de l'hydrocarbure dans l'eau ; sa concentration autour de la protéine est très faible dans les conditions de cette expérience. Pour augmenter la quantité d'hydrocarbure en contact avec la protéine, C. Hansch et T. Fujita (4), puis Franke et Büchner (5) ont utilisé la méthode d'Avignan (6).

L'hydrocarbure est mis en suspension dans du gel de séphadex G 25.

La protéine, albumine de sérum humain (HSA), en solution tamponnée, est agitée pendant 16 heures, dans l'obscurité et à 27°C. A l'équilibre, le

mélange est filtré. La concentration de la protéine dans le filtrat est déterminée par la méthode de Hinsberg (7), celle de l'hydrocarbure par spectrométrie d'absorption ou de fluorescence. Ce dernier dosage présente des difficultés graves d'étalonnage (évaluation du coefficient d'extinction molaire $\mathcal{E}$ de l'hydrocarbure dans la protéine, par exemple).

Si on désigne par $\bar{\nu}$ le rapport du nombre de molécules d'hydrocarbure introduites par molécule de protéine, Franke (8) calcule dans l'exemple du benzo (a) pyrène et de l'albumine du sérum humain :

$$\bar{\nu} = 0,06_3 \pm 0,03$$

Braud a répété cette expérience, en modifiant cependant certaines conditions. Une colonne de séphadex G 50 est saturée en benzo (a) pyrène finement divisé préalablement, par ultrasons.

Une solution aqueuse tamponnée d'albumine de sérum de boeuf est mise au contact de l'hydrocarbure, dans la colonne même contenant le gel.

Nous suivons ainsi la cinétique de fixation de l'hydrocarbure pendant trois semaines.

La protéine est dosée par la méthode colorimétrique de Lowry (9), l'hydrocarbure par absorption dans l'ultra-violet.

Nous décrirons plus loin plus en détail ces dosages, plus particulièrement la méthode utilisée pour déterminer le coefficient $\mathcal{E}$ dans l'albumine.

Braud a confirmé la valeur proposée par Franke :

$$\bar{\nu} = 0,06_4$$

bien que les protéines diffèrent (nous verrons que les albumines de sérum de boeuf et humain fixent l'hydrocarbure de la même façon).

I-2) Une nouvelle méthode de fixation

Il se dissout donc très peu d'hydrocarbure dans la protéine quand on les met simplement en présence, en milieu aqueux. Le, ou les sites de fixation, sont loin d'être occupés en totalité ($\bar{\nu} \ll 1$).

Analysant ce résultat, nous nous sommes demandés si cette limitation n'était pas due essentiellement au milieu. L'hydrocarbure, hydrophobe, pénètre difficilement dans la protéine à partir de la phase aqueuse. De son côté la protéine, hydrosoluble, présente probablement à sa surface un réseau serré de résidus aminés polaires, peu propices à l'interaction avec l'hydrocarbure aromatique. On peut ainsi penser que les sites accepteurs de ce dernier sont peu accessibles de l'extérieur, quand la protéine est en solution dans l'eau.

C'est alors que nous avons pensé qu'un intermédiaire organique, bon solvant de l'hydrocarbure, pourrait faciliter sa fixation.

De plus, moins polaire que l'eau, il pourrait faciliter l'interaction de l'hydrocarbure et des résidus non polaires et donc l'accès au(x) site(s) protéique(s). Cet intermédiaire devrait satisfaire à une obligation majeure : ne pas dénaturer irréversiblement la protéine. C'est ainsi que nous avons choisi le chloro-2 éthanol (ClE) qui maintient ou renforce les liaisons par pont hydrogène des protéines et donc leur structure secondaire (10).

Ce mode d'introduction de l'hydrocarbure (H) dans la protéine (P) peut être schématisé simplement :

$$H + P \xrightarrow{ClE \ / \ H_2O} H\,P$$

Nous verrons plus loin (paragraphe 4) qu'on introduit ainsi beaucoup plus d'hydrocarbure que par simple mise en contact dans l'eau.

Mais on peut se demander si ce procédé présente un intérêt biologique.

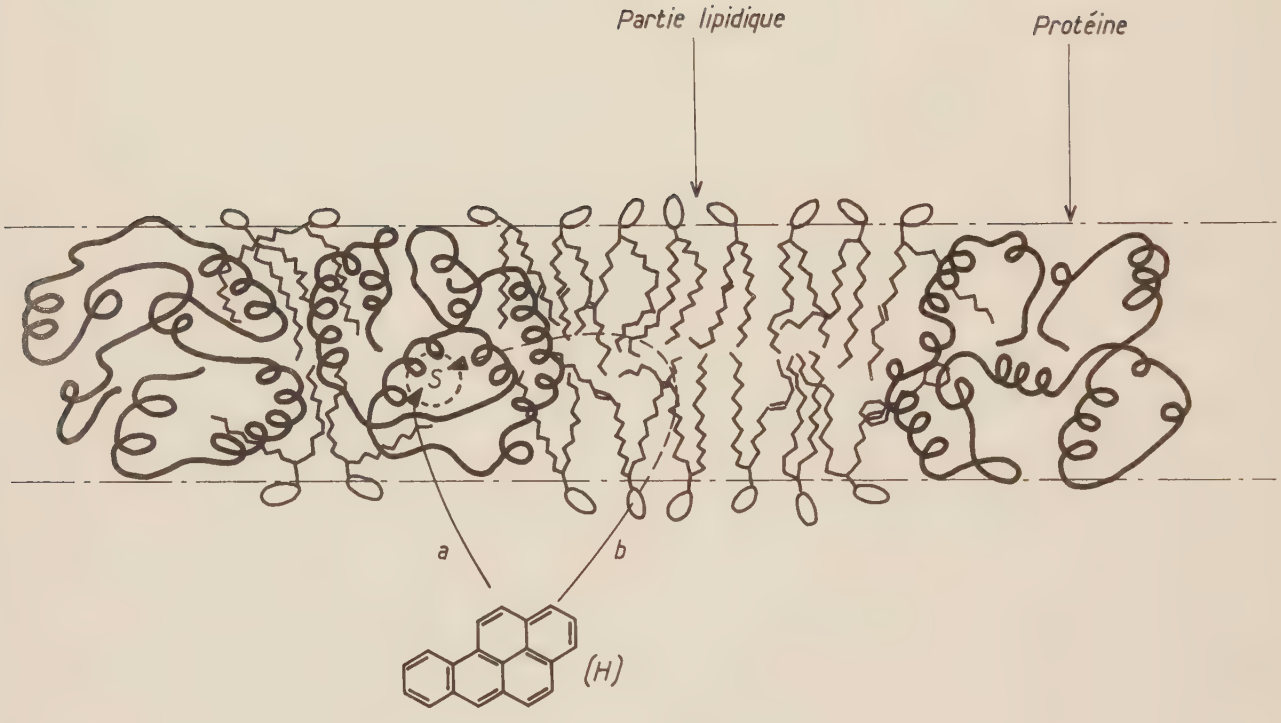


Figure 1 Le modèle de membrane de P. BOTHOREL et LUSSAN
L'hydrocarbure polycyclique H face à la membrane : Un site hydrophobe (S) de la protéine peut être atteint par la voie directe (a) ou la voie (b) passant par la zone lipidique.

I-3) Justification biologique d'un intermédiaire organique

Rappelons-nous tout d'abord comment un hydrocarbure polycyclique dont on veut tester l'action cancérogène est introduit dans l'animal de laboratoire.

Dispersé ou dissous dans un solvant hydrophobe (toluène, acétone, huile, etc.), il est par exemple déposé sur la peau de l'animal. On le retrouve rapidement sous forme concentrée dans la graisse épidermique. Puis il est transporté, très probablement dans un milieu non aqueux (gouttelette lipidique ?), jusqu'aux cellules épithéliales. Plus tard, si le composé est actif, une tumeur se développera dans ces cellules (épithélioma). Arrivé devant une de ces cellules, comment l'hydrocarbure y pénètre-t-il ? Nous rentrons là dans le domaine des suppositions. Il rencontre tout d'abord la membrane plasmique. Son squelette comporte essentiellement des protéines et des lipides. D'après Bothorel et Lussan (11), ainsi que d'autres auteurs modernes (12), des protéines globulaires baignent dans une couche bimoléculaire lipidique (voir figure 1) ; les résidus aminés polaires sont en contact avec l'eau, les résidus non polaires interagissant avec les chaînes de lipides.

Admettons, comme le suggèrent certains biologistes (1), que l'acte primaire du cancérogène ait bien lieu sur la membrane, et plus précisément, sur une protéine.

Deux chemins s'offrent à l'hydrocarbure (H) se dirigeant vers un site hydrophobe (S) de la protéine :

la voie directe (a) et la voie (b), passant par la zone lipidique.

La voie (a) suppose le franchissement de la zone polaire, hydrophobe, de la protéine ; la voie (b) comporte une dissolution initiale dans le milieu organique lipidique. Le premier mode d'introduction est à rapprocher des expériences de fixation de l'hydrocarbure par simple mise en contact dans l'eau. Le second comporte un intermédiaire organique, comme dans nos expériences avec le chloro-2 éthanol.

En résumé, on peut considérer que les deux modes de solubilisation in vitro de l'hydrocarbure avec et sans chloro-2 éthanol sont une première

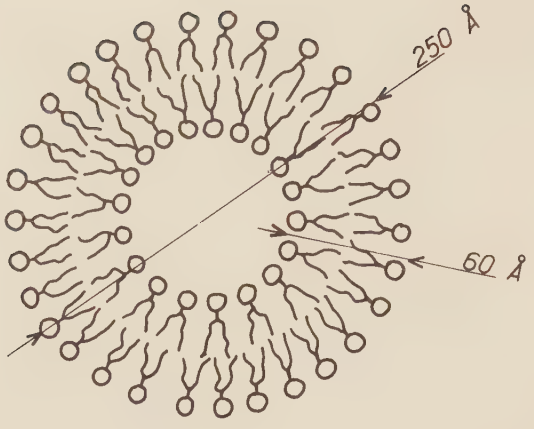


Figure 2 Représentation schématique d'un liposonne vésiculaire de lécithine naturelle.

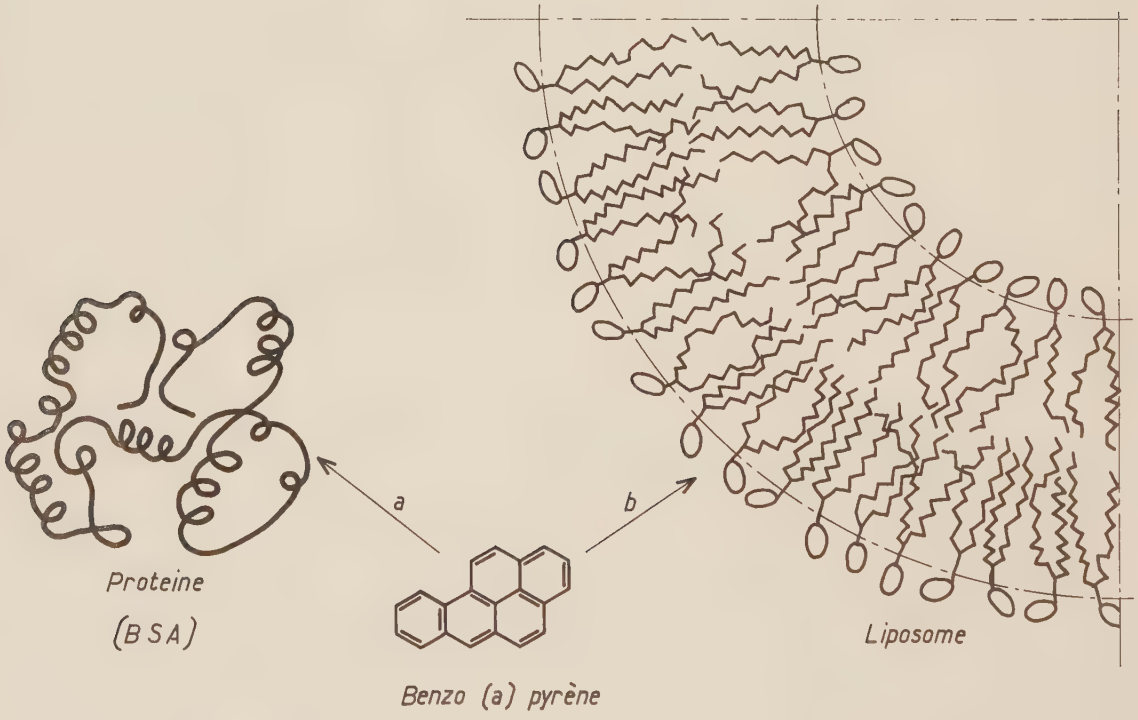


Figure 3 Partage.

Partage du Benzo (a) pyrène entre l'albumine de sérum de boeuf (BSA) et un liposonne de lécithine naturelle.

simulation de deux voies d'introduction de l'hydrocarbure sur un site actif d'une protéine membranaire.

En réalité, dans notre milieu, le chloro-2 éthanol est réparti d'une manière homogène, il est parfaitement soluble dans l'eau, alors que la zone aliphatique des lipides est séparée de l'extérieur par les têtes polaires.

On pourrait craindre que ces têtes constituent une barrière aussi difficile à franchir que les résidus polaires de la protéine, et, qu'en définitive, la probabilité de l'hydrocarbure de pénétrer dans la zone lipidique ne soit pas supérieure à celle d'entrer dans la protéine.

Braud (13) a montré dernièrement qu'il n'en était rien. Il a étudié la cinétique de solubilisation du benzo (a) pyrène dans l'albumine de sérum de boeuf et dans des vésicules sphériques d'un phospholipide naturel : la lécithine (voir figures 2 et 3).

Ces vésicules, ou liposomes, sont formées d'une couche bimoléculaire de lipides et simulent assez bien les propriétés des phospholipides dans la membrane.

Lorsque l'équilibre est atteint, la concentration en hydrocarbure est beaucoup plus grande dans les liposomes que dans l'albumine. C'est ainsi que dans un milieu qui comporterait autant de protéines(en poids) que de lipides, il y aurait 750 fois plus d'hydrocarbure dans la zone lipidique que dans la protéine (T = 5°C).

En conclusion, la zone lipidique constitue un réservoir intermédiaire où peut se concentrer l'hydrocarbure polycyclique avant de s'introduire dans la protéine, sans avoir à franchir d'obstacle polaire.

S'il en est ainsi, la voie (b) doit permettre d'atteindre des taux de fixation égaux ou supérieurs à ceux de la voie (a).

Avec un intermédiaire organique bien moins sophistiqué que les lipides, le chloro-2 éthanol, nous allons voir maintenant que les taux de fixation obtenus ainsi sont effectivement beaucoup plus importants que par interaction directe de l'hydrocarbure et de la protéine.

PREPARATION DES SOLUTIONS AQUEUSES DU COMPLEXE HYDROCARBURE-PROTEINE

II-1) Nature des constituants

L'origine des constituants des solutions étudiées est indiquée sur le tableau I.

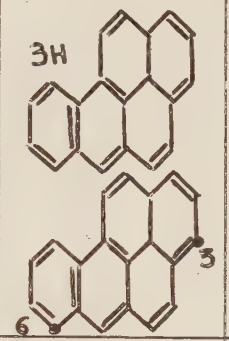
Le benzo (a) pyrène commercial et non radioactif est systématiquement repurifié en le dissolvant dans du toluène et en traitant la solution obtenue par du charbon actif, à l'ébullition. La pureté du produit recristallisé est vérifiée à l'aide des spectrométries d'absorption et de fluorescence. Le produit étant photosensible, toutes les expériences décrites par la suite ont été effectuées en lumière rouge.

Les produits marqués au tritium et au carbone I4 sont repurifiés par le fournisseur et livrés avec des chromatogrammes certifiant leur pureté (chromatographie sur colonne d'alumine).

Les protéines commerciales n'ont pas été repurifiées. Nous avons vérifié la pureté de l'albumine de sérum de boeuf par mesure de la viscosité et par ultracentrifugation analytique (voir paragraphes III-2-2 et III-2-3).

Nous avons vérifié que les acides gras qui pourraient se trouver fixés sur la protéine, à titre d'impureté, ne perturbent pas nos études (voir paragraphe III-1).

TABLEAU 1 : CARACTERISTIQUES DES PRODUITS UTILISES

NOM	Formule	Origine	Etat	Poids moléculaire	Activité cancérogène	Symbole
Benzo (a) pyrène		Fluka (puriss)	cristallisé	252, 3	très forte	BP
Produit tritié (activité : 0, 3 à 1, 7 Ci/m mole suivant le lot).		C.E.A.	cristallisé ou solution organique			
Produit marqué au 14C Position 3 & 6 (activité : 0, 5 Ci/m mole)		Amersham	cristallisé ou solution organique			
Chloro-2 Ethanol	$ClCH_2 - CH_2OH$	Prolabo purifié	liquide	80, 5		CLE
Albumine de sérum de boeuf		Nutritional Biochemicals corporation	cristallisé	69 000		BSA
Albumine de sérum humain		" (4 X)	"	70 380		HSA
Lysozyme		" (3 X)	"	17 500		LYS
Cytochrome C de coeur de cheval (type III)		Sigma	"	13 400		CYTC

II-2) Protocole expérimental (voir organigramme - tableau 2).

II -2 -1) La solution initiale

Une solution aqueuse de protéine est tout d'abord préparée. Elle est tamponnée (pH = 7, 8), sa force ionique est contrôlée (0, 145 M de NaCl). Ces conditions rappellent les conditions habituelles du milieu cellulaire et les protéines étudiées n'y sont pas dénaturées.

L'hydrocarbure polycyclique est introduit sous forme d'une quantité connue d'une solution concentrée dans le toluène. Le chloro-2 éthanol est alors ajouté aux deux solutions précédentes. L'ensemble se présente sous la forme d'une solution parfaitement homogène de composition :

solution organique de l'hydrocarbure	$\leqslant$ 0, 150 ml.
Chloro-2 éthanol	3, 00 ml.
solution aqueuse tamponnée de protéine	2, 00 ml.

II-2-2) Fixation de l'hydrocarbure

La solution précédente est maintenue trois minutes à la température de l'azote liquide. Les solvants sont chassés sous vide d'une pompe à palettes. Le résidu est obtenu libre de tout solvant à la suite de quatre lyophilisations successives avec reprise chaque fois par l'eau.

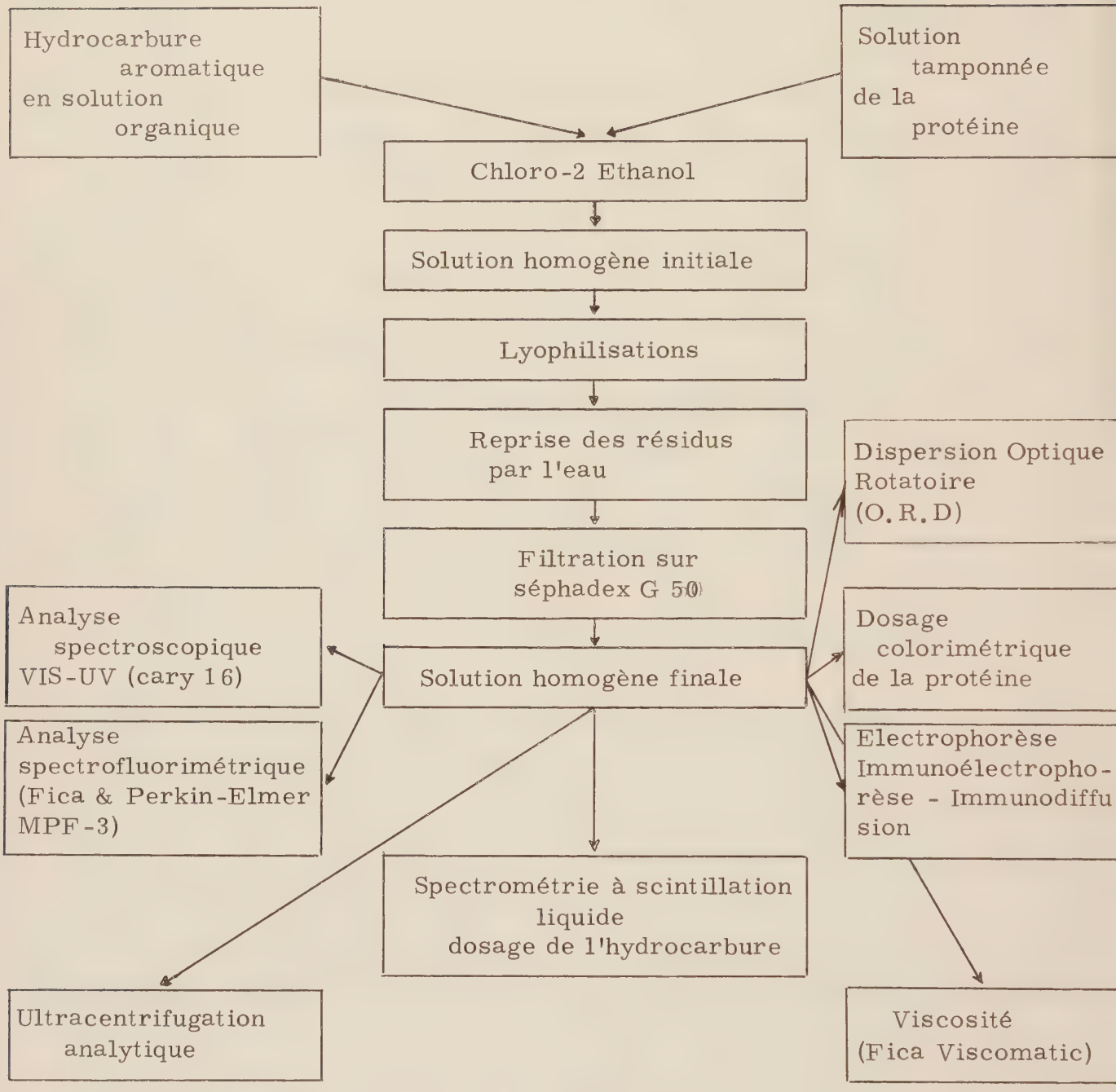
L'ultime lyophilisat est dissous dans deux millilitres d'eau. La solution obtenue au terme de ce traitement contient généralement une faible quantité d'hydrocarbure polycyclique libre sous la forme d'une suspension de microcristaux.

Il s'agit de l'hydrocarbure en excès, non fixé à la protéine.

II-2-3) Elimination de l'hydrocarbure en excès

La filtration sur gel permet de séparer l'hydrocarbure cristallisé, du complexe hydrocarbure - protéine en solution dans le milieu. Le faible volume de la solution à traiter permet un réajustement, si nécessaire du pH et de la force ionique.

TABLEAU 2 : ORGANIGRAMME EXPERIMENTAL



Nous avons choisi comme support le gel de séphadex G 50 qui présente d'excellentes propriétés d'adsorption pour les molécules à faible poids moléculaire, et pour les hydrocarbures polycycliques cristallisés en particulier.

Les caractéristiques de la colonne sont les suivantes :

hauteur = 200 mm ; diamètre = 15 mm

La colonne est éluée par le milieu tampon pH = 7, 8 ; force ionique 0, 145 M NaCl.

Des fractions égales sont recueillies après filtration dans les tubes d'un collecteur. La détection des tubes contenant le complexe hydrocarbure-protéine est réalisée :

- en procédant à une analyse en continu de l'absorption à 280 nm (domaine d'absorption de la protéine) ou par analyse colorimétrique de la protéine à l'aide d'un réactif, l'amidoschwarz (14).

Une goutte d'éluant est déposée sur une bande de cellogel imprégnée de ce réactif, et bleuit si elle contient l'albumine.

- en observant la fluorescence de l'hydrocarbure dans la solution, lorsqu'il est fixé sur la protéine, après excitation au moyen d'une lampe ultraviolette (maximum de l'excitation à 350 nm).

Les fractions contenant le complexe sont rassemblées. La dilution par rapport à la prise initiale est de 1 à 4. Au terme de ce traitement, nous obtenons une solution homogène de l'hydrocarbure piégé dans la protéine.

Cette solution est conservée pour analyses ultérieures à 4°C et dans l'obscurité.

II-3) Dosages des constituants

II-3-1) Dosage de l'hydrocarbure

Il faut connaître avec précision la concentration en hydrocarbure polycyclique dans deux milieux très différents :

la solution initiale dans le toluène et les solutions finales du complexe hydrocarbure-protéine.

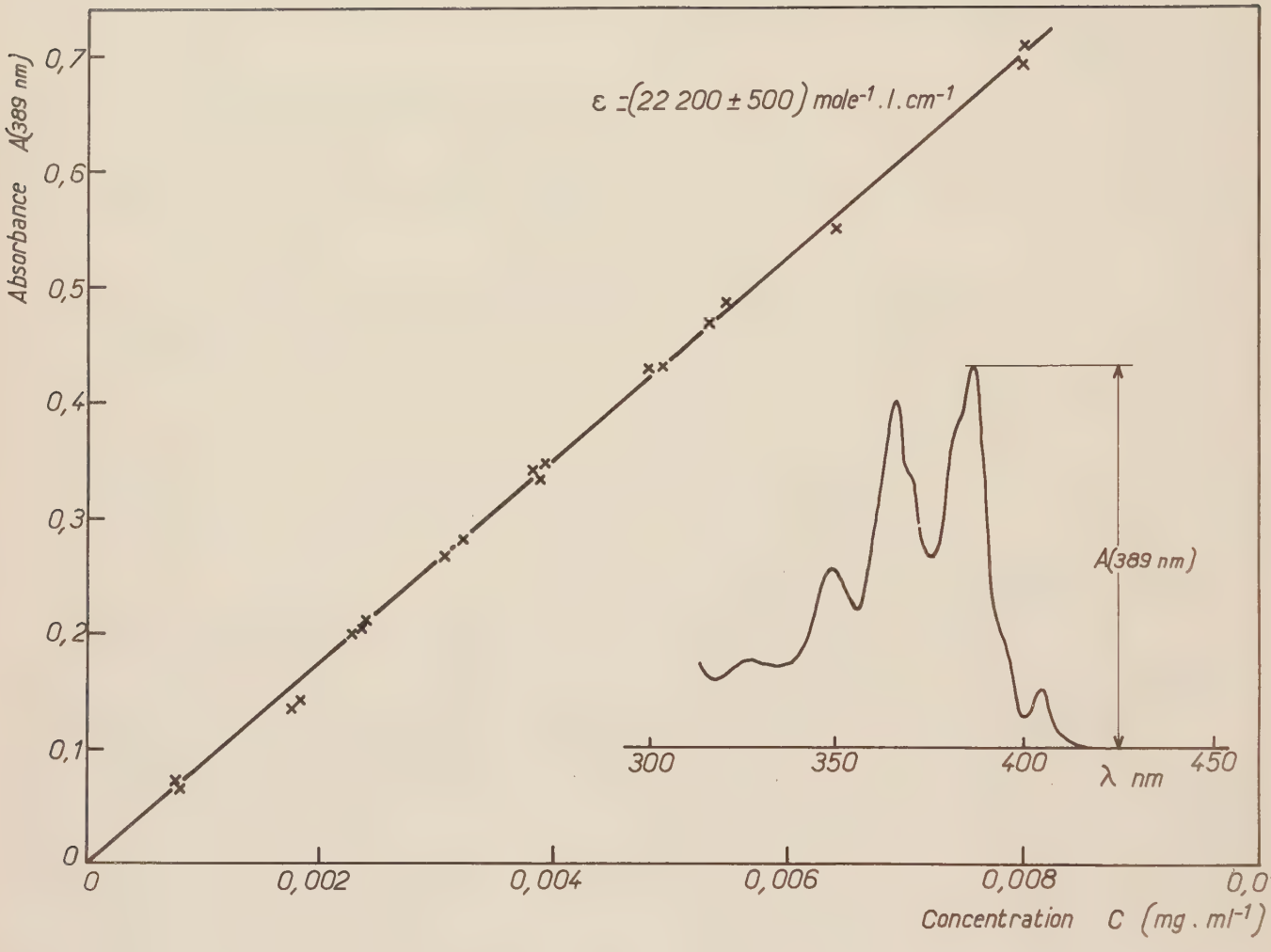


Figure 4 Le Benzo (a) pyrène en solution dans le Toluène :
Mesure de l'absorbance en fonction de la concentration $A_{389nm} = f(C_{mg/ml})$

- Solution initiale

Le problème est simple. Un poids déterminé d'hydrocarbure est dissous dans une fiole jaugée contenant du toluène. Nous verrons plus loin que nous sommes amenés à utiliser aussi des solutions toluéniques d'hydrocarbure dont nous ignorons la concentration. Pour la déterminer, nous avons mesuré l'absorbance à 389 nm de solutions étalons (voir figure 4). Il nous suffit ensuite de mesurer l'absorbance de la solution toluénique inconnue, à la même longueur d'onde, pour déterminer sa concentration en hydrocarbure.

- Solutions finales du complexe hydrocarbure-protéine

Les techniques physiques habituelles de dosage, comme l'absorption ultra-violette, ne sont plus adaptées. Quand le taux de fixation est faible, la concentration en hydrocarbure est de l'ordre de $2,5.10^{-5}$ mg/ml ; l'analyse spectrométrique n'est plus possible (voir figure 4).

Il n'existe d'ailleurs pas de moyen pour déterminer directement le coefficient d'extinction molaire de l'hydrocarbure dans la protéine.

Nous avons alors choisi d'utiliser un hydrocarbure marqué au tritium, ou au carbone 14, et de doser sa concentration en mesurant sa radioactivité, par comptage en scintillation liquide. Les détails concernant les mesures de radioactivité sont donnés en appendice.*

Nous remercions vivement Monsieur le professeur Baraud et Monsieur Cassagne du laboratoire de biochimie - faculté des sciences -, ainsi que Monsieur le professeur Blanquet et Monsieur Lapparat de l'unité INSERM n° 58, qui nout ont très aimablement aidé lors de nos premières mesures.

Il faut dans un premier temps déterminer l'activité spécifique d'une solution d'hydrocarbure marqué, dont on a déterminé préalablement la concentration, par absorption ultra-violette.

On opère ainsi :

---

* Appendice : analyse quantitative du benzo (a) pyrène tritié ou marqué au carbone 14 par comptage en scintillation liquide.

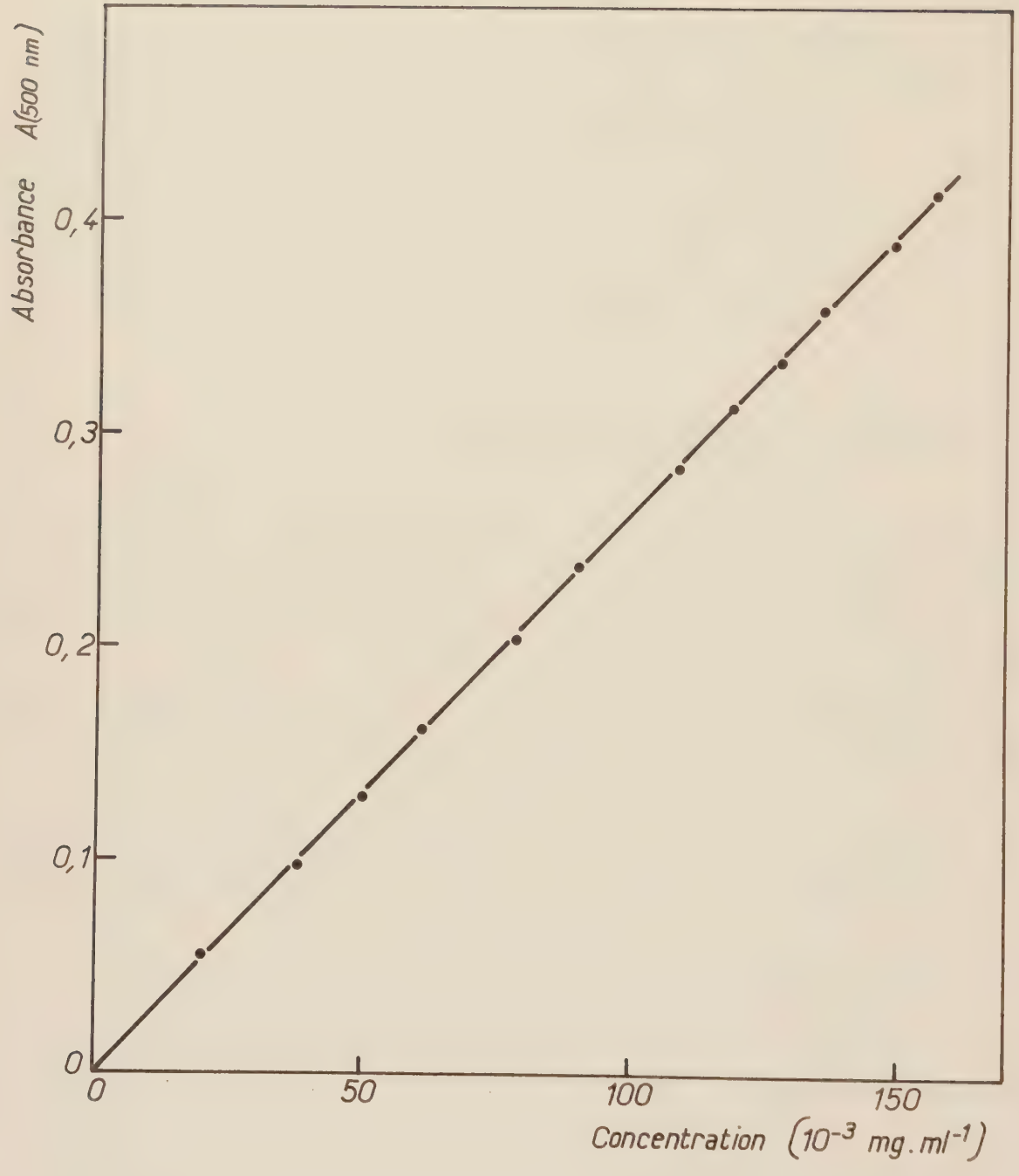


Figure 5 Courbe d'étalonnage de la concentration d'albumine de sérum de boeuf selon la méthode de LOWRY $A_{500\ nm} = f(C_{mg/ml})$

TABLEAU 3 : CARACTERISTIQUES DES SOLUTIONS INITIALES DE BENZO (a) PYRENE.

Solution n°	Isotope	CONCENTRATION		Activité spécifique mCi / mM
		mg/ml	mM/l	
1	3 H	1	3, 96	0, 227
2	3 H	1	3, 96	0, 136
	14 C			0, 205
3	3 H	1, 5	5, 94	227, 5
4	3 H	10	39, 63	0, 029

1 mCi = $3,7.10^{7}$ désintégrations par seconde

Un volume V de solution toluénique d'hydrocarbure marqué est ajouté à un volume V' de solution toluénique d'hydrocarbure non marqué.

L'absorption à 389 nm est mesurée et la concentration totale en hydrocarbure est ainsi déterminée. Puis l'activité spécifique de la solution est déterminée à l'aide du compteur en scintillation liquide.

Par la suite, une simple mesure de l'activité d'une solution du complexe protéine-hydrocarbure marqué permet de déterminer la concentration de ce dernier.

Nous avons représenté sur le tableau 3 leurs caractéristiques obtenues en jouant sur les volumes V et V'.

II-3-2) Dosage de la protéine

La concentration en albumine a été déterminée par la méthode colorimétrique de Lowry et Coll. (9) (La BSA commerciale contient de 5 à 6 % d'eau).

Les réactifs utilisés dans le dosage sont d'une part une solution cuivrique alcaline C préparée en mélangeant 50 ml d'une solution A :

2 % de Na_2CO_3 dans la soude 0,10 N

et 1 ml d'une solution B :

0,5 % $CuSO_4$, 5 H_2O dans 1 % de tartrate de sodium

et un réactif phénolique E :

réactif de Folin dilué deux fois et rendu acide (1N).

Des solutions contenant moins de 0,150 mg de protéine dans 0,5 ml de solution aqueuse tamponnée (pH = 7,8 ; force ionique = 0,145 M NaCl) sont traitées par 2 ml de réactif C et agitées ; après 10 mn d'incubation, 0,2 ml de réactif de Folin (E) sont ajoutés. La solution est rapidement homogénéisée. L'absorption à 500 nm de la solution préparée est effectuée 1/2 heure exactement après l'introduction de ce dernier réactif.

La concentration de la protéine est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec la protéine d'étude et dans les mêmes conditions expérimentales (voir figure 5).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

III-1) Variation du taux de fixation $\bar{\nu}$

Nous avons choisi pour définir le taux de fixation le rapport $\bar{\nu}$ du nombre de molécules d'hydrocarbure au nombre de molécules de protéine dans la solution finale ($\frac{m_{BP}}{m_{BSA}}$). Nous l'avons étudié en fonction du rapport $\bar{\nu}_o$ correspondant à la solution initiale, et de la concentration en protéine ($\frac{m^\circ_{BP}}{m^\circ_{BSA}}$). Les résultats obtenus avec le benzo (a) pyrène et l'albumine du sérum de boeuf, sont représentés sur les figures 6, 7 et 8, et d'une manière plus détaillée, sur les tableaux 4 à 9.

Nous avons préparé 21 solutions de complexe benzo (a) pyrène - albumine de sérum de boeuf, de concentration initiale en protéine égale à 2, 5 mg/ml, le rapport $\bar{\nu}_o$ variant de 1, 05 à 18, 4.

Les points représentatifs des figures 6 et 7 se placent le long d'une droite, compte tenu de l'erreur expérimentale (10 % environ). Le nombre de valeurs expérimentales est suffisant pour qu'on puisse appliquer la méthode des moindres carrés et c'est ainsi qu'a été déterminée la droite moyenne de la figure 6.

Il était important de s'assurer que l'albumine ne contienne pas de corps gras au départ (c'est normalement un transporteur d'acides gras dans le sang). En effet, des molécules de corps gras fixées dans la protéine pourraient dissoudre le benzo (a) pyrène.

Nous avons appliqué la méthode de Chen (15) pour dégraisser l'albumine de sérum de boeuf et fixé le benzo (a) pyrène sur les échantillons ainsi préparés.

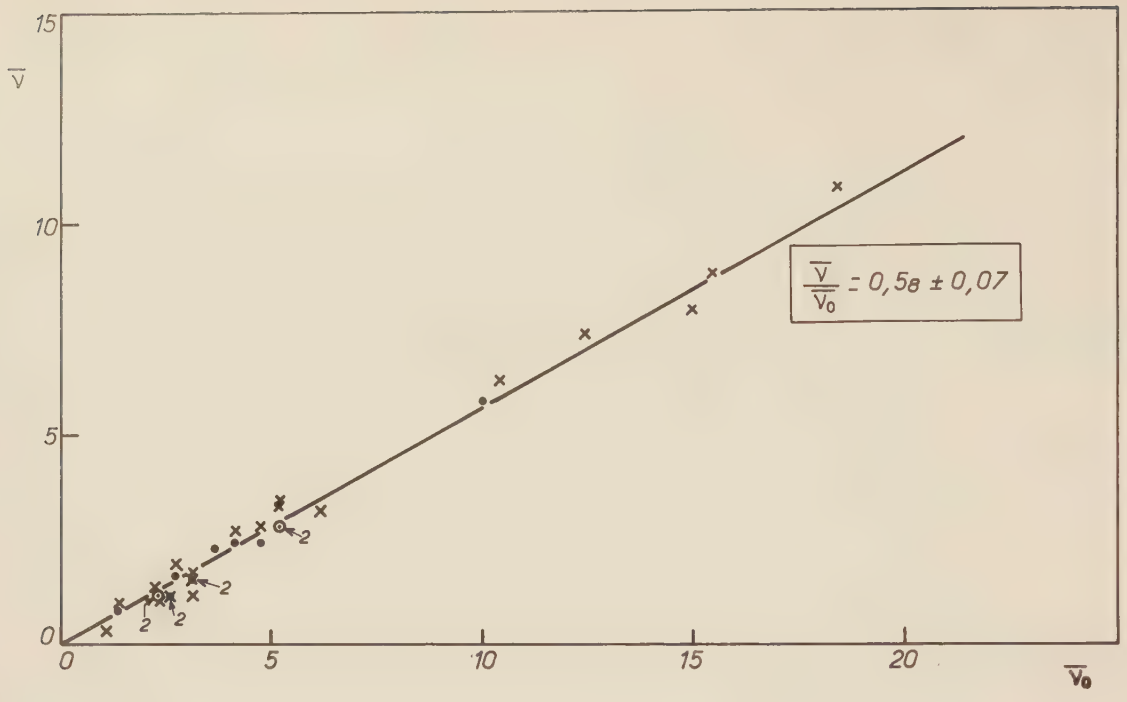


Figure 6 Introduction du Benzo (a) pyrène dans la BSA (t = 22°C)
Concentration initiale de la protéine 2,5 mg/ml
Dosage du Tritium x ;
Dosage du Carbone 14 . :
cas de deux expériences conduisant aux mêmes résultats : x (dosages carbone 14 et tritium), . (deux dosages de carbone 14).

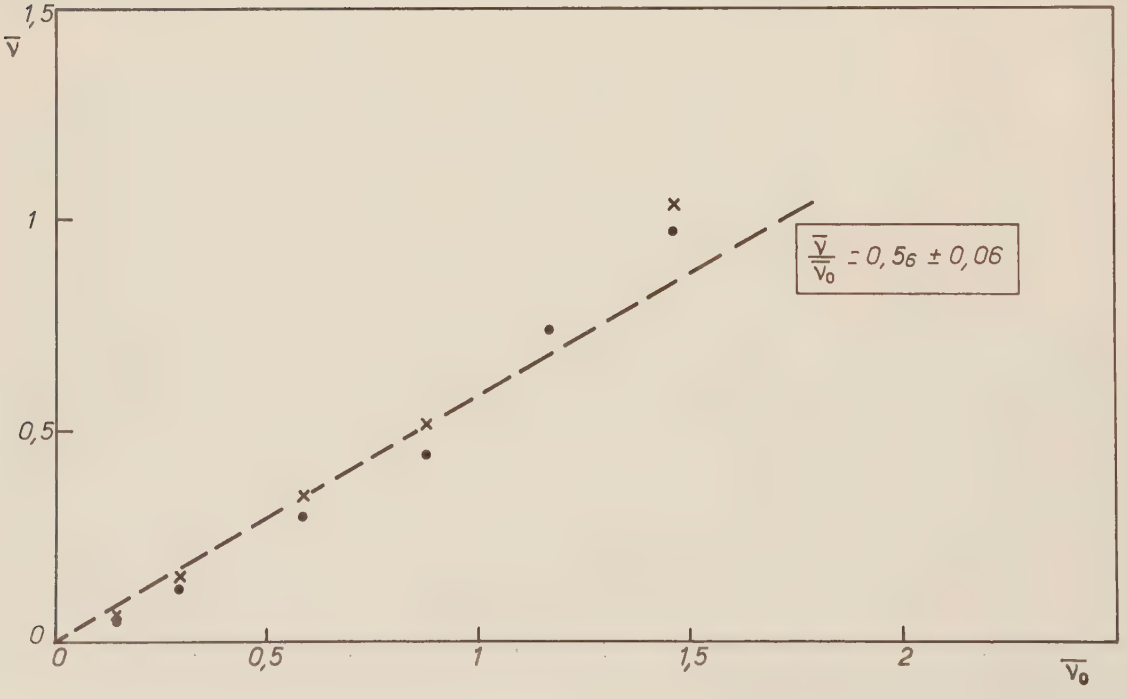


Figure 7 Introduction du Benzo (a) pyrène dans la BSA (t = 22°C)
Concentration initiale de la protéine 5 mg/ml
x dosage du Tritium
. dosage du Carbone 14

TABLEAU 4 : BENZO (a) PYRENE - ALBUMINE DE SERUM DE BOEUF

Concentration initiale de la protéine 2, 5 mg/ml ($36,2.10^{-6}$ mM/ml)

SOLUTION INITIALE		SOLUTION FINALE				
concentration en benzo(a)pyrène 10^{-5}mMole/ml	$\bar{\nu}_o$	concentration en BP 10^{-6}mMole/ml		concentration en BSA 10^{-6}mMole/ml	$\bar{\nu}$	
		3 H	14 C		3 H	14 C
4, 0	1, 05	3, 3		10, 0	0, 4	
5, 0	1, 35	9, 0	8, 0	9, 0	1, 0	0, 9
8, 5	2, 35	9, 5		9, 0	1, 1	
9, 5	2, 60	9, 5	9, 5	8, 0	1, 2	1, 2
10, 0	2, 70	18, 5	16, 0	10, 0	1, 9	1, 7
11, 0	3, 12	13, 0	11, 5	7, 5	1, 7	1, 6
11, 5	3, 14	14, 5		9, 0	1, 6	
11, 5	3, 14	12, 5		11, 0	1, 2	
13, 0	3, 65		17, 0	7, 0		2, 3
15, 0	4, 15	16, 0	15, 0	6, 0	2, 7	2, 5
17, 0	4, 75	28, 0	24, 0	10, 0	2, 8	2, 5
19, 0	5, 20	25, 0	22, 0	7, 5	3, 3	2, 9
19, 0	5, 20	29, 0	25, 0	8, 5	3, 4	2, 9
22, 0	6, 15	27, 0		8, 5	3, 2	
37, 5	10, 40	39, 0		6, 0	6, 3	
54, 5	15, 00	92, 0		11, 5	8, 0	
55, 5	15, 30	90, 0		10, 0	8, 8	
66, 5	18, 40	100, 0		9, 0	10, 8	
8, 0	2, 23	11, 0	9, 5	8, 0	1, 4	1, 2
8, 0	2, 23	11, 0	9, 5	8, 5	1, 3	1, 1
45, 0	12, 40	57, 0		7, 5	7, 4	

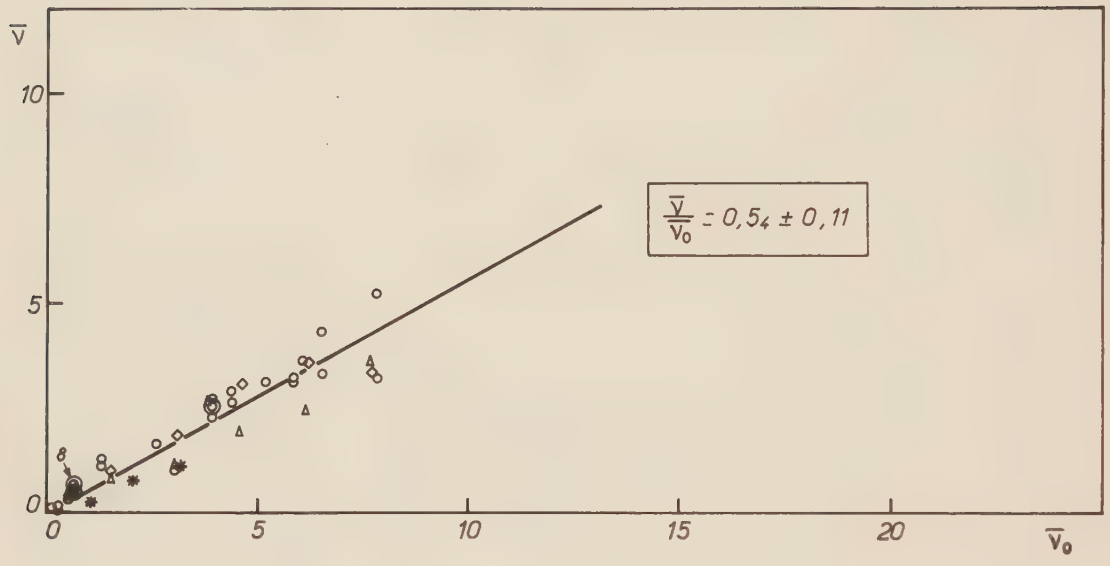


Figure 8 Introduction du Benzo (a) pyrène dans la BSA (t = 22 °C)

Concentration initiale de la protéine :

◇ 20 mg/ml

△ 10 mg/ml

o 5 mg/ml

* 1,245 mg/ml

(dosage du tritium)

TABLEAU 5 : BENZO (a) PYRENE - ALBUMINE DE SERUM DE BOEUF

Concentration initiale de la protéine 5 mg/ml ($72,5.10^{-6}$ mM/ml)

SOLUTION INITIALE		SOLUTION FINALE				
concentration en benzo(a)pyrène 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}_o$	concentration en BP 10^{-6} mMole/ml		concentration en BSA 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}$	
		3 H	14 C		3 H	14 C
9,5	0,130	1,2		13,5	0,10	
9,5	0,130	1,2		13,5	0,08	
10,5	0,145	1,1	0,9	17,5	0,06	0,05
19,0	0,260	3,5		23,0	0,15	
19,0	0,260	3,0		23,0	0,13	
21,0	0,290	2,5	2,2	17,5	0,15	0,13
38,0	0,520	8,5		22,0	0,40	
38,0	0,520	7,5		21,5	0,35	
42,5	0,585	5,5	5,0	17,0	0,35	0,30
46,0	0,635	9,5		18,0	0,55	
46,0	0,635	6,5		10,5	0,65	
46,0	0,635	13,5		22,0	0,60	
46,0	0,635	11,5		19,0	0,60	
46,0	0,635	9,0		19,5	0,45	
46,0	0,635	8,0		16,0	0,50	
46,0	0,635	6,0		11,5	0,55	
63,5	0,880	9,0	7,5	17,5	0,50	0,45
85,0	1,15		13,0	17,5		0,75
95,0	1,30	18,0		15,5	1,2	
95,0	1,30	12,0		9,0	1,3	
105,0	1,45	18,5	17,5	18,0	1,0	1,0

TABLEAU 6 : BENZO (a) PYRENE - ALBUMINE DE SERUM DE BOEUF

Concentration initiale de la protéine 5 mg/ml ($72,5.10^{-6}$ mMole/ml

SOLUTION INITIALE		SOLUTION FINALE				
concentration en benzo(a)pyrène 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}_o$	concentration en BP 10^{-6} mMole/ml		concentration en BSA 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}$	
		3 H	14 C		3 H	14 C
170, 0	2, 35	30, 0	26, 0	18, 0	1, 7	1, 5
190, 0	2, 60	12, 5		11, 0	1, 7	
222, 0	3, 05	22, 0		22, 0	1, 0	
284, 0	3, 90	49, 5		18, 5	2, 7	
284, 0	3, 90	49, 5		21, 0	2, 4	
284, 0	3, 90	46, 0		18, 0	2, 6	
319, 0	4, 40	51, 0		19, 5	2, 6	
319, 0	4, 40	58, 5		22, 0	2, 7	
378, 0	5, 20	67, 0		23, 0	3, 0	
425, 0	5, 90	55, 0		17, 5	3, 2	
425, 0	5, 90	70, 5		22, 5	3, 2	
444, 0	6, 10	72, 0		22, 5	3, 3	
473, 0	6, 50	81, 5		22, 5	3, 6	
473, 0	6, 50	71, 5		21, 5	3, 4	
567, 0	7, 80	80, 0		18, 5	4, 4	
567, 0	7, 80	112, 0		21, 5	5, 3	
567, 0	7, 80	86, 0		20, 0	4, 3	

Les résultats obtenus sont identiques aux précédents (voir tableau 10). Si notre albumine contient des traces de corps gras, elles n'influent pas sur le taux de fixation du benzo (a) pyrène.

Afin d'étudier si la concentration initiale en protéine avait un effet sur ces résultats, nous avons fait 56 autres expériences, en faisant varier cette concentration de 1,245 mg à 20 mg d'albumine de sérum de boeuf/ml.

Tous les points représentatifs obtenus se répartissent autour de la droite moyenne précédente ($\bar{\nu}/\bar{\nu}_\circ = 0,56$).

Le résultat essentiel que nous obtenons donc est que le taux de fixation $\bar{\nu}$ de l'hydrocarbure sur la protéine varie proportionnellement à $\bar{\nu}_\circ$ et ne dépend apparemment pas de la concentration initiale en protéine.

Il n'est cependant pas possible de fixer une quantité trop grande d'hydrocarbure ; quand $\bar{\nu}$ tend à dépasser 20, les résultats ne sont plus très reproductibles, les solutions se troublent fortement, et un louche apparaît. C'est également ce qu'ont observé d'autres auteurs, quand l'albumine est complexée avec un nombre trop important de molécules de sulfates aliphatiques (16).

Nous avons répété ces expériences en remplaçant l'albumine de sérum de boeuf par l'albumine de sérum humain (HSA), le cytochrome C (CyTc) et le lyzozyme (LYS). Dans tous les cas $\bar{\nu}$ varie proportionnellement à $\bar{\nu}_\circ$, à l'erreur expérimentale près (voir figures 9 à 11 et tableaux 11, 12 et 13).

Nous avons encore fait varier la concentration initiale en protéine (cytochrome C), sans effet apparent sur le rapport $\bar{\nu}/\bar{\nu}_\circ$. Celui-ci varie par contre d'une protéine à l'autre, comme on le voit sur la figure 12. Les rapports relatifs aux deux albumines sont assez voisins, mais très supérieurs à ceux obtenus avec les autres protéines.

Une première conclusion s'impose : l'utilisation d'un intermédiaire organique dans notre protocole expérimental augmente considérablement le nombre de molécules d'hydrocarbure qu'on peut fixer sur une molécule de protéine, par rapport à la méthode directe ($\bar{\nu}$ peut atteindre 20 dans l'albumine de sérum de boeuf, contre 0,063).

TABLEAU 7 : BENZO (a) PYRENE - ALBUMINE DE SERUM DE BOEUF

Concentration initiale de la protéine 10 mg/ml (145.10^{-6} mMole/ml)

SOLUTION INITIALE		SOLUTION FINALE			
concentration en benzo(a)pyrène 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}_o$	concentration en BP 10^{-6} mMole/ml		concentration en BSA 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}$
		3 H	14 C		3 H
222, 0	1, 53	39, 5		46, 0	0, 85
444, 0	3, 05	52, 5		46, 0	1, 2
665, 0	4, 60	85, 0		44, 0	1, 9
888, 0	6, 15	113, 0		46, 0	2, 5
1.110, 0	7, 65	177, 0		49, 0	3, 5

TABLEAU 8 : BENZO (a) PYRENE - ALBUMINE DE SERUM DE BOEUF

Concentration initiale de la protéine 1, 245 mg/ml (18.10^{-6} mM/ml)

SOLUTION INITIALE		SOLUTION FINALE			
concentration en benzo(a)pyrène 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}_o$	concentration en BP 10^{-6} mMole/ml		concentration en BSA 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}$
		3 H	14 C		3 H
19, 0	1, 05	0, 95		4, 3	0, 20
38, 0	2, 10	3, 10		4, 0	0, 80
57, 0	3, 15	4, 45		4, 0	1, 00

TABLEAU 9 : BENZO (a) PYRENE - ALBUMINE DE SERUM DE BOEUF

Concentration initiale de la protéine 20 mg/ml (290.10^{-6}mM/ml)

SOLUTION INITIALE		SOLUTION FINALE			
concentration en benzo(a)pyrène 10^{-6}mMole/ml	$\bar{\nu}_o$	concentration en BP 10^{-6}mMole/ml		concentration en BSA 10^{-6}mMole/ml	$\bar{\nu}$
		3 H	14 C		3 H
449, 0	1, 55	65, 0		66, 0	1, 0
899, 0	3, 10	119, 0		63, 0	2, 0
1122, 0	3, 85	162, 0		61, 0	2, 5
1348, 0	4, 65	197, 0		63, 0	3, 0
1797, 0	6, 20	207, 0		57, 0	3, 5
2244, 0	7, 75	208, 0		61, 0	3, 5

TABLEAU 10 : BENZO (a) PYRENE - ALBUMINE DE SERUM DE BOEUF

Concentration initiale de la protéine 2, 5 mg/ml ($36, 2.10^{-6}$mM/ml)

SOLUTION INITIALE		SOLUTION FINALE			
concentration en benzo(a)pyrène 10^{-6}mMole/ml	$\bar{\nu}_o$	concentration en BP 10^{-6}mMole/ml		concentration en BSA 10^{-6}mMole/ml	$\bar{\nu}$
		3 H	14 C		3 H
38, 0	1, 05	5, 0		9, 0	0, 55
85, 0	2, 35	12, 0		9, 0	1, 30
114, 0	3, 15	25, 0		13, 0	1, 90
190, 0	5, 25	29, 0		14, 0	2, 10

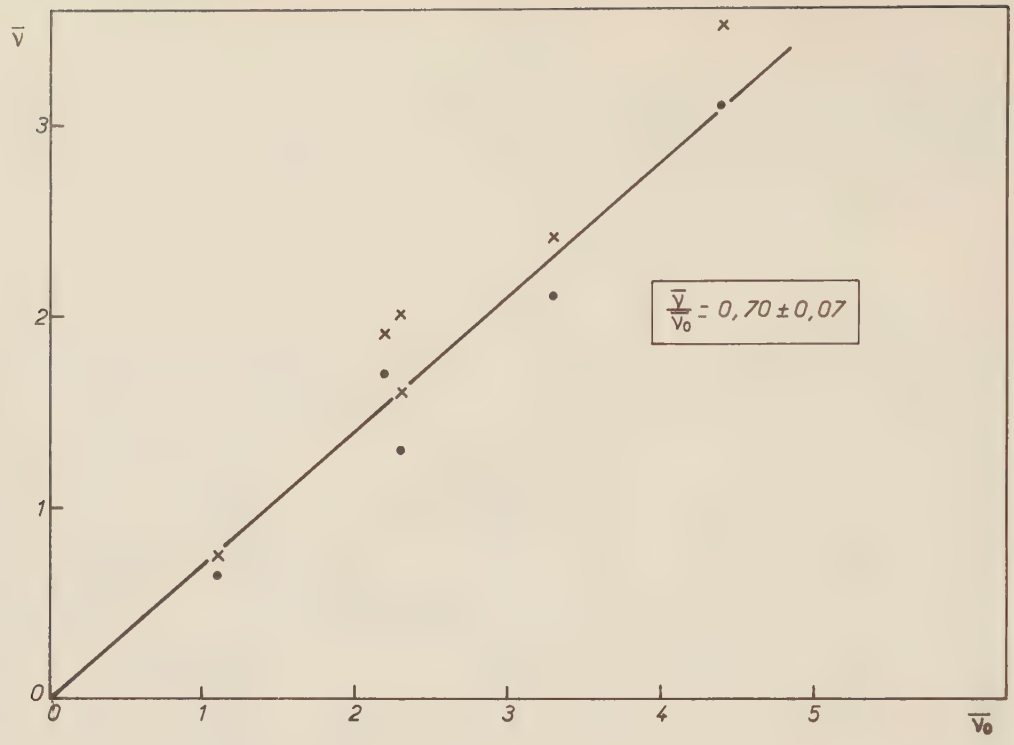


Figure 9 Introduction du Benzo (a) pyrène dans la HSA

Concentration initiale de la protéine 2, 5 mg/ml

x dosage du tritium

. dosage du Carbone 14

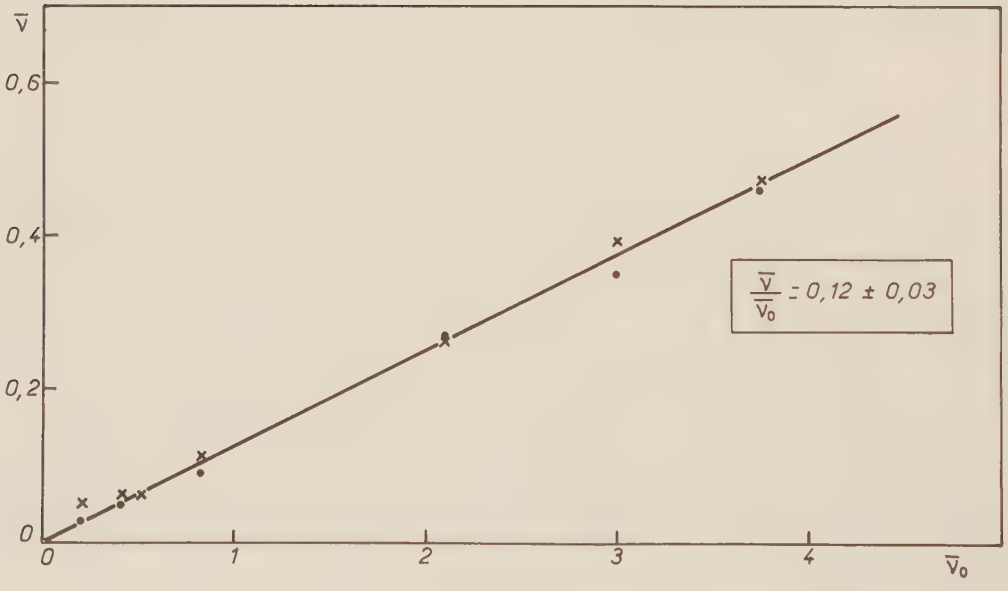


Figure 10 Introduction du Benzo (a) pyrène dans le CYTCROMEC

Concentrations initiales de la protéine : 0, 5 et 2, 5 mg/ml

x dosage du tritium

. dosage du Carbone 14

TABLEAU 11 : BENZO (a) PYRENE - ALBUMINE DE SERUM HUMAIN

Concentration de la protéine 2, 5 mg/ml ($35, 5.10^{-6}$ mM/ml)

SOLUTION INITIALE		SOLUTION FINALE				
concentration en benzo(a)pyrène 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}_o$	concentration en BP 10^{-6} mMole/ml		concentration en HSA 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}$	
		3 H	14 C		3 H	14 C
35, 5	1, 10	6, 0	5, 3	8, 0	0, 75	0, 65
78, 0	2, 20	14, 5	13, 0	7, 5	1, 90	1, 70
117, 0	3, 30	20, 5	17, 5	8, 5	2, 40	2, 10
156, 0	4, 40	29, 0	25, 5	8, 5	3, 50	3, 10
82, 0	2, 30	12, 0	10, 0	7, 5	1, 60	1, 30
82, 0	2, 30	13, 5	11, 0	7, 0	2, 00	1, 60
45, 0	12, 70	41, 0		7, 5	5, 30	-

TABLEAU 12 : BENZO (a) PYRENE - CYTOCHROME C DE COEUR DE CHEVAL

Concentration initiale de la protéine 0, 5 et 2, 5 mg/ml
($28, 6.10^{-6}$ mM/ml) et (143.10^{-6} mM/ml)

SOLUTION INITIALE		SOLUTION FINALE				
concentration en benzo(a)pyrène 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}_o$	concentration en BP 10^{-6} mMole/ml		concentration en CYTC 10^{-6} mMole/ml	$\bar{\nu}$	
		3 H	14 C		3 H	14 C
38, 0	0, 20	1, 4	1, 0	30, 0	0, 05	0, 03
76, 0	0, 40	2, 4	1, 7	40, 0	0, 05	0, 05
95, 0	0, 50	2, 2	-	40, 0	0, 05	-
31, 0	0, 83	0, 5	0, 4	3, 7	0, 15	0, 10
77, 0	2, 10	1, 1	1, 2	4, 3	0, 25	0, 25
110, 0	3, 00	1, 2	1, 1	3, 1	0, 40	0, 35
139, 0	3, 75	2, 0	2, 0	4, 3	0, 45	0, 45

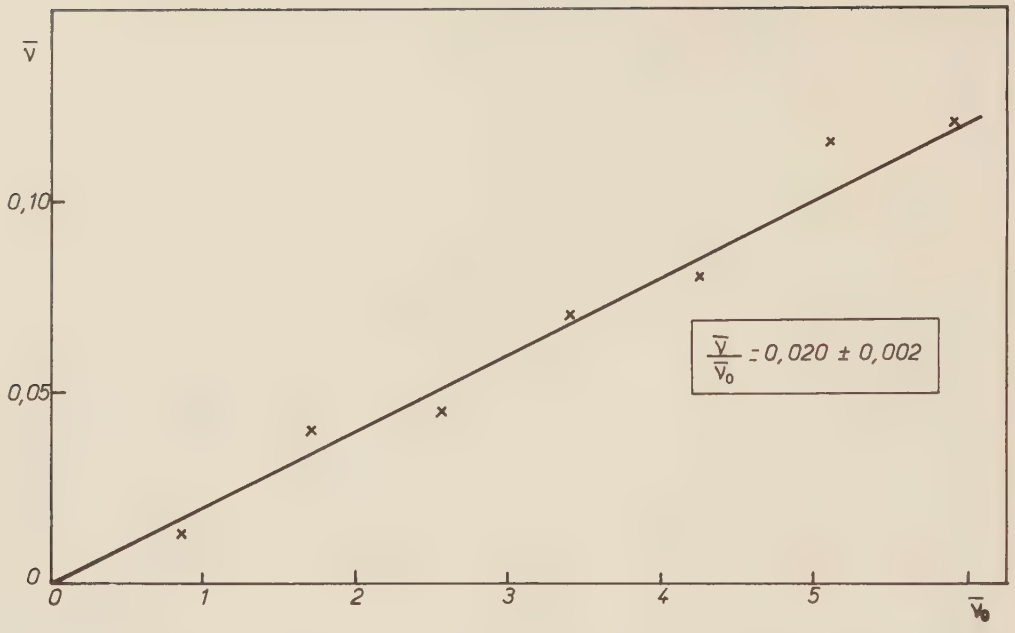


Figure 11 Introduction du Benzo (a) pyrène dans le LYSOZYME
Concentration initiale de l'Enzyme 0, 6 mg/ml
x dosage du tritium

TABLEAU 13 : BENZO (a) PYRENE - LYSOZYME
Concentration de la protéine 0, 6 mg/ml
(45.10^{-6}mM/ml)

SOLUTION INITIALE		SOLUTION FINALE			
concentration en benzo(a)pyrène 10^{-6}mMole/ml	$\bar{\nu}_\circ$	concentration en BP 10^{-8}mMole/ml		concentration en LYS 10^{-6}mMole/ml	$\bar{\nu}$
		3 H	14 C		3 H
29, 0	0, 85	1, 5		1, 3	0, 01
58, 0	1, 70	3, 5		0, 8	0, 04
87, 0	2, 55	6, 5		1, 5	0, 05
116, 0	3, 40	9, 5		1, 4	0, 07
145, 0	4, 25	15, 5		2, 0	0, 08
174, 0	5, 10	18, 5		1, 6	0, 12
203, 0	5, 90	21, 5		1, 8	0, 12

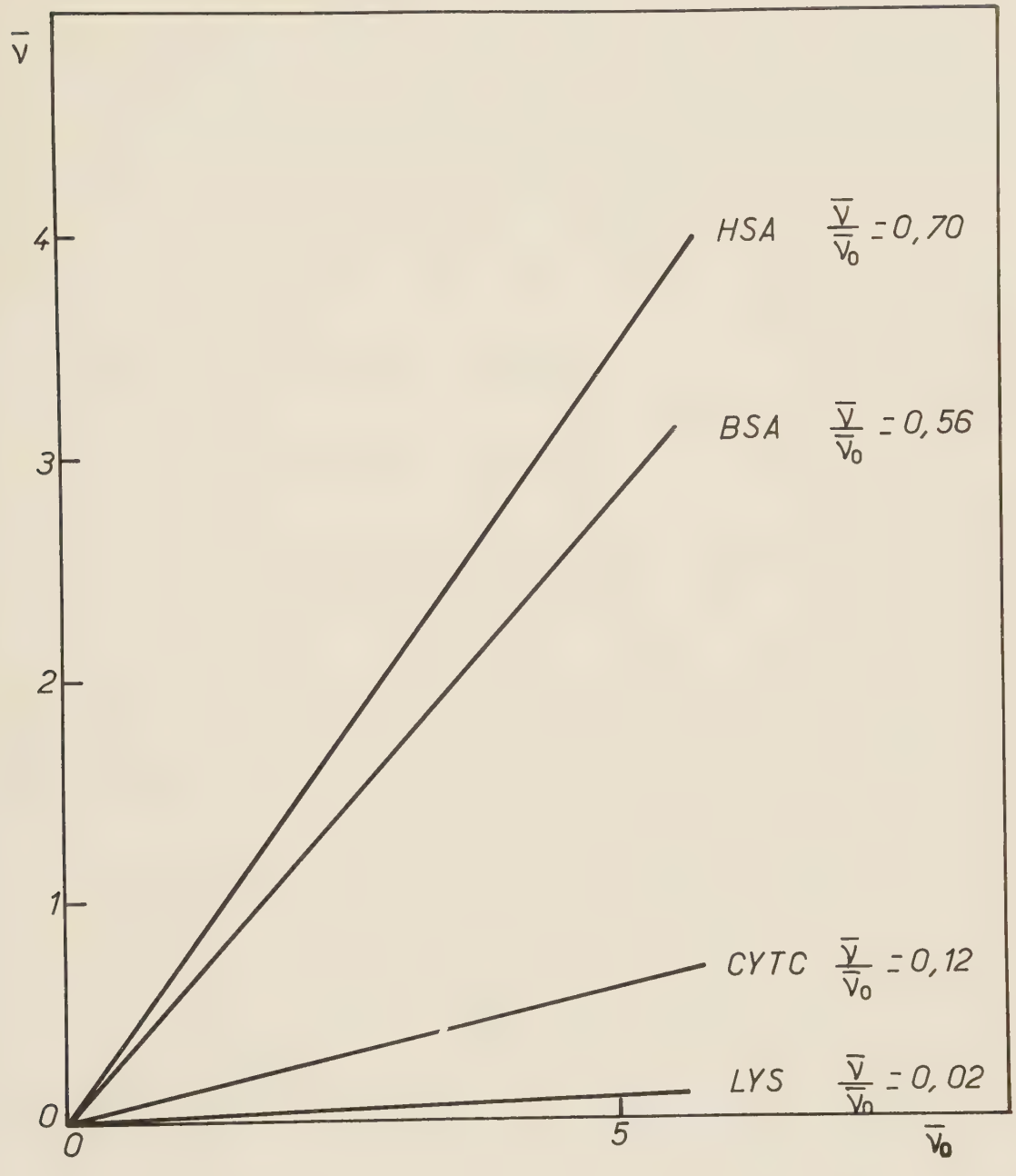


Figure 12 Introduction du Benzo (a) pyrène dans différentes protéines

Figure récapitulative

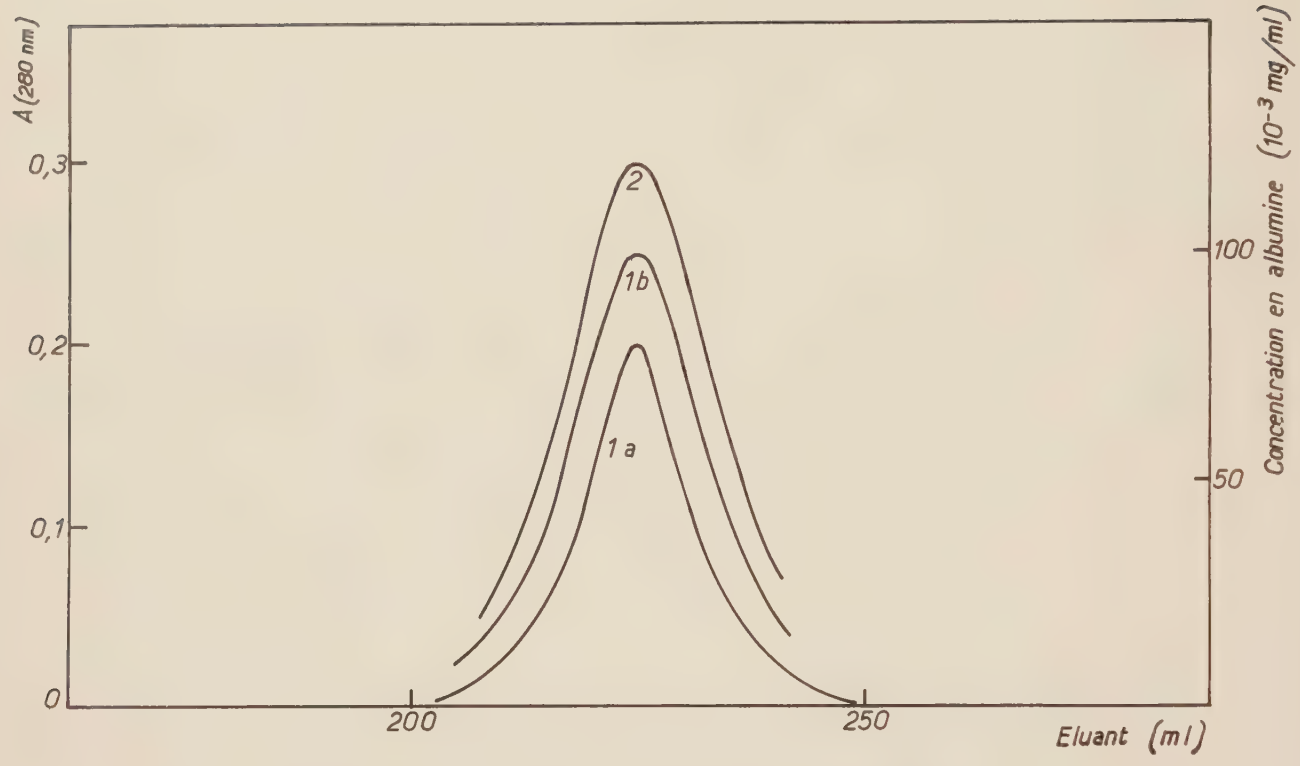


Figure 13 Filtration sur gel de Sephadex 4B des Solutions d'albumine :

1 - Solution de protéine commerciale (P_M = 7, 8 ; force ionique : 0, 145 M en NaCl).

a) absorbance à 280 nm ;

b) dosage par la méthode de Lowry

2 - Solution d'albumine contenant du Benzo (a) pyrène ($\bar{\nu}$ = 1, 15) ; dosage par la méthode de Lowry (l'absorption de la protéine à 280 nm serait perturbée par celle de l'hydrocarbure).

Une question se pose immédiatement : la protéine qui a fixé autant de molécules d'hydrocarbure est-elle encore intacte ? N'a-t-elle pas été dénaturée au cours du traitement ? (La structure secondaire des albumines est perturbée quand des sulfates aliphatiques à longue chaîne sont fixés en grand nombre (16)). Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé de nombreux tests de contrôle qui vont être décrits maintenant.

III-2) Contrôle de la structure de la protéine.

III-2-1) Filtration sur gel.

La première technique utilisée pour opérer ce contrôle est la filtration sur gel de sépharose 4 B (hauteur de la colonne : 450 mm ; diamètre : 26 mm).

Dans les conditions initiales choisies (pH = 7,8 ; force ionique : 0,145 M en NaCl), la protéine n'est évidemment pas dénaturée. Après filtration sur cette colonne d'une solution dans le tampon de l'albumine commerciale, on obtient dans l'éluant (tampon) une répartition correcte de la protéine (un seul pic symétrique), comme on peut le voir sur la figure 13 (courbes 1a et 1b) ; la présence de l'albumine est repérée par son absorption pour une longueur d'onde de 280 nm (courbe 1a) ou par dosage chimique (courbe 1b).

Après le traitement complet, comprenant la fixation de l'hydrocarbure et l'élimination de l'excès par filtration sur gel de sépharose 4 B, la protéine apparaît dans les mêmes fractions d'élution et le pic est encore celui d'une espèce macromoléculaire unique (voir figure 13, courbe 2. L'albumine est dosée chimiquement).

III-2-2) Viscosité

La viscosité de nos solutions a été mesurée par B. Le Grivès, à l'aide du viscosimètre à tube capillaire de la société Fica (type Ubbelhode).

Le diamètre du capillaire est de 0,5 mm, le temps d'écoulement est mesuré automatiquement et affiché. Une enceinte de thermostatation a été

réalisée afin de maintenir la température à 25, 00 ± 0, 01°C.

Les temps d'écoulement sont mesurés dans ces conditions avec une précision de 0, 025 %. La viscosité η varie en fonction du temps d'écoulement t et de la densité d du liquide étudié selon la relation :

$$\frac{\eta}{d} = A\,t - \frac{B}{t}$$

Les constantes A et B ont été déterminées à l'aide de solutions aqueuses de glycérol de viscosité connue (15) (η étant exprimé en centipoises) :

$A = 0, 01165\ (cm^2 \times s^{-2})$ $\qquad$ $B = 1, 4875\ cm^2$

Le Grivès a mesuré ainsi la viscosité intrinsèque $\eta^\circ = \frac{\eta}{C}$ de nos solutions d'albumine, de concentration C (voir tableaux 14, 15, 16) (17) (18).

Cette viscosité reste la même, que la protéine soit originelle ou qu'elle contienne le benzo (a) pyrène.

Nous avons étudié également par viscosimétrie les diverses étapes de notre processus expérimental. Quel que soit le nombre de lyophilisations, qu'on ait introduit ou non le toluène ou le chloro-2 éthanol, la viscosité intrinsèque de la solution aqueuse terminale d'albumine a la même viscosité intrinsèque, à l'erreur expérimentale près.

Nous ne décelons ainsi aucune variation de cette propriété de la protéine, au cours du traitement et même lorsqu'elle renferme plusieurs molécules d'hydrocarbure polycyclique. Il ne semble donc pas que la structure tertiaire globale de l'albumine soit perturbée.

III-2-3) Ultracentrifugation analytique

Grâce à l'obligeance de Monsieur le professeur Bové et de son collaborateur Monsieur Dupont, nos solutions ont pu être étudiées par ultracentrifugation analytique dans leur laboratoire de physiologie et biochimie végétale de l'INRA (domaine de la Grande Ferrade -33- Pont de la Maye). Tout comme une solution d'albumine commerciale dans le milieu tamponné, les solutions d'albumine ayant fixé le benzo (a) pyrène présentent un pic symétrique, caractéristique d'une seule espèce macromoléculaire, apparemment

TABLEAU 14

C_{BSA} mg/ml	$\bar{\nu}$	η° Cps	C_{BSA} mg/ml	$\bar{\nu}$	η° Cps
1,12	0	0,9039	4,6	0,98	0,9046
1,21	0,055	0,9044	4,35	1,90	0,9042
1,19	0,14	0,9043	4,25	2,60	0,9038
1,17	0,32	0,9042	4,35	3,10	0,9042
1,19	0,48	0,9043	3,95	3,60	0,9028
1,19	0,74	0,9043	4,20	3,40	0,9036
1,25	0,97	0,9046			
1,23	1,60	0,9044			

TABLEAU 15

C_{BSA} mg/ml	Nombre de lyophilisations	Nombre de filtrations	η° Cps
0,59	0	1	0,9039
0,55	1	1	0,9038
0,56	2	1	0,9038
0,57	3	1	0,9038
0,50	4	1	0,9038
0,59	6	1	0,9038

TABLEAU 16

C_{BSA} mg/ml	nombre de lyophilisations	nombre de filtrations	toluène (μl)	chloro-2 éthanol (ml)	η° Cps
5,03	0	0	0	0	0,9039
4,80	2	1	0	0	0,9025
4,90	4	1	50	3	0,9025
5,05	4	1	50	3	0,9026
4,70	6	1	0	0	0,9033

TABLEAU 17 : COEFFICIENT DE SEDIMENTATION DE SOLUTION D'ALBUMINE (t = 20° C).

SOLUTION	concentration de la protéine (mg/ml)	$S_{20, w}$
Solution de BSA commerciale non traitée pH = 7, 8 ; force ionique : 0, 145 M en NaCl.	2, 50 5, 03	4, 20 4, 20
Solution de BSA 2 lyophilisations 1 filtration sur gel pH = 7, 8 ; force ionique : 0, 145 M en NaCl.	4, 85	4, 20
Solution de BSA 6 lyophilisations 1 filtration sur gel pH = 7, 8 ; force ionique : 0, 145 M en NaCl.	2, 34 4, 68	4, 50 4, 10
Solution de BSA 4 lyophilisations en présence de 3 ml de chloro-2 éthanol 1 filtration sur gel pH = 7, 8 ; force ionique : 0, 145 M en NaCl.	2, 40 4, 80	4, 20 4, 05
Solution de BSA 4 lyophilisations en présence de 3 ml de chloro-2 éthanol et de 50 µl de toluène pH = 7, 8 ; force ionique : 0, 145 M en NaCl.	2, 55 5, 10	4, 30 4, 30
Solution de BSA ayant subi le protocole complet en présence de benzo(a)pyrène pH = 7, 8 ; force ionique : 0, 145 M en NaCl.	4, 35 4, 60	4, 35 4, 30

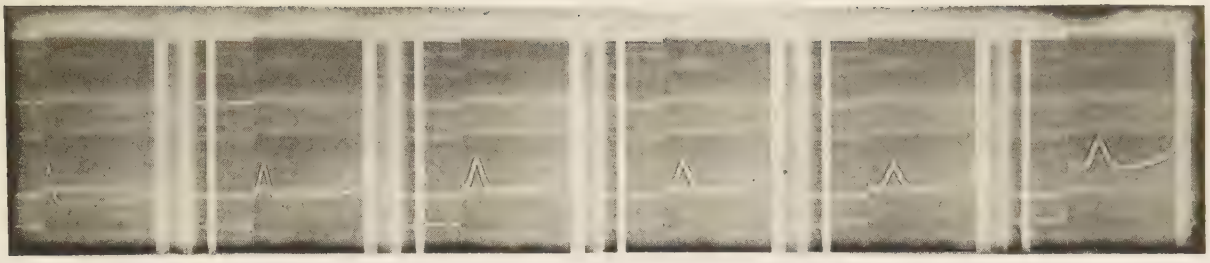


Figure 14 Ultracentrifugation analytique, Cliché Schlieren (20°C, 60.000 tours/mn angle 55°, cellule aluminium 1 secteur)
Solution de BSA (C = 4, 68 mg/ml), lyophilisée 6 fois et filtrée sur Sephadex G 50.

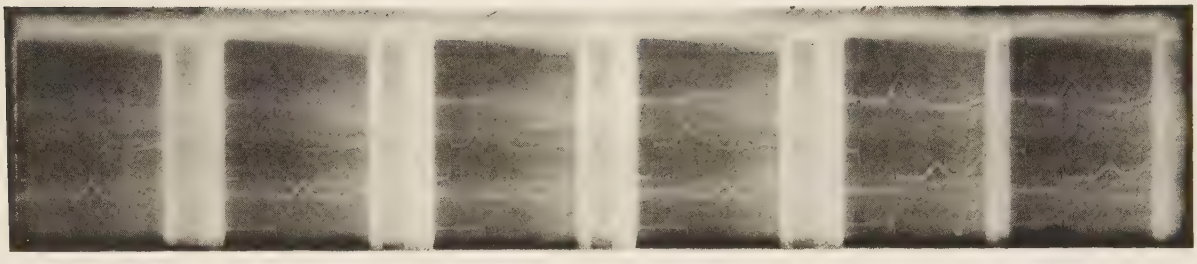
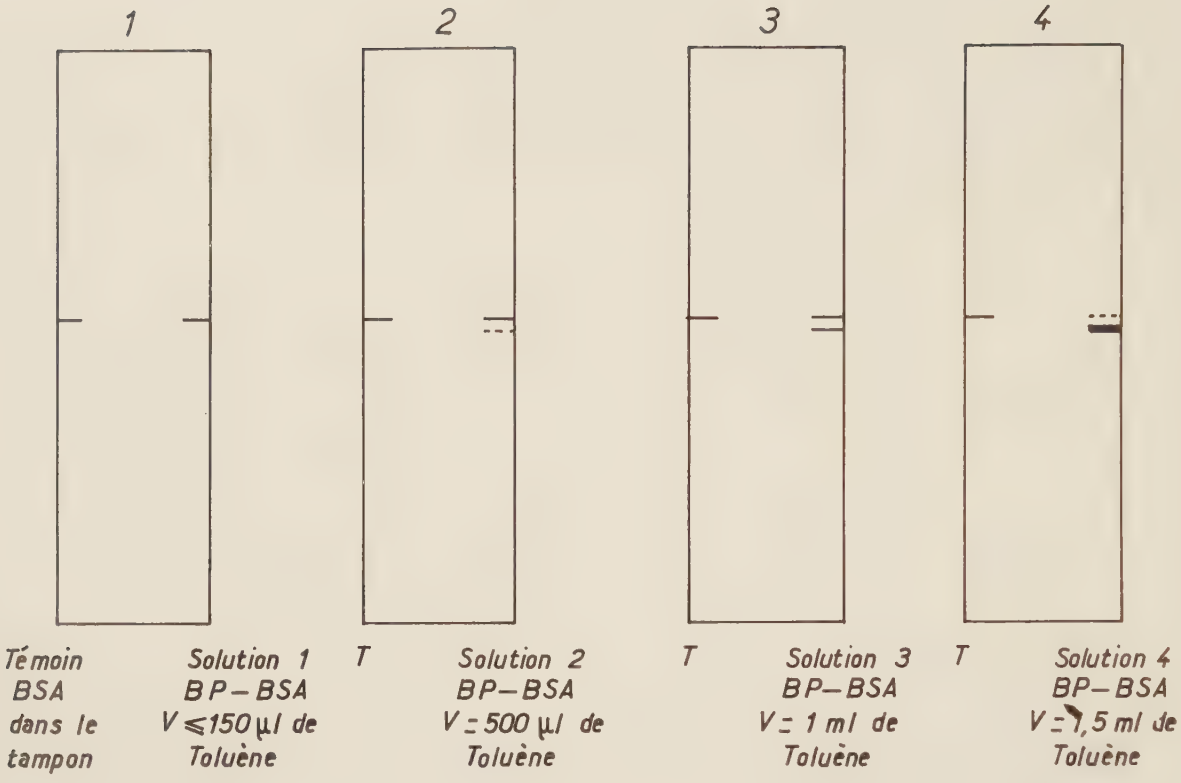


Figure 15 Ultracentrifugation Analytique ; Cliché Schlieren (20°C, 60 000 tours/mn, angle 50°.)

. Image supérieure : Solution de BSA commerciale
C = 5,03 mg/ml - Cellule
double secteur.

. Images inférieures: Solution du complexe BP-BSA ($\bar{\nu}$ = 3)
Cellule à frontière synthétique

à gauche la concentration en BSA est de 4,60 mg/ml
à droite la concentration en BSA est de 2,30 mg/ml



Exemple obtenu dans l'expérience n° 2

Figure 16 Electrophorèse de solution de BSA : la dénaturation par le Toluène

non dégradée (voir figures 14 et 15).

Nous avons voulu cependant étudier à nouveau toutes les phases de notre protocole expérimental. Pour cela, nous avons centrifugé des solutions correspondant aux diverses étapes du traitement (voir tableau 17). Dans tous les cas un seul pic symétrique est apparu et le coefficient de sédimentation calculé est compris entre 4, 0 et 4, 5 s, compte tenu de l'erreur expérimentale. Ce sont également les valeurs données par les autres auteurs pour la BSA.

La sédimentation de l'albumine traitée ou non traitée a donc les mêmes caractéristiques.

III-2-4) Electrophorèse

Nous avons réalisé des électrophorèses sur cellogel de solutions d'albumine de sérum de boeuf.

L'analyse des solutions contenant le complexe protéine-hydrocarbure est faite par rapport à une solution témoin d'albumine non traitée. Nous rappelons que dans le protocole adopté, on introduit toujours moins de 150 µl de solutions toluéniques de benzo (a) pyrène.

On voit sur la figure 16 que la protéine traitée, liée à l'hydrocarbure, migre dans le champ électrique exactement comme la protéine originelle. L'éluant conducteur est un milieu tamponné de véronal de sodium (8, 25 g/l dans l'eau). Une tension de 220 volts est appliquée pendant une demi-heure. Après migration, l'emplacement de la protéine est repéré par traitement à l'amidoschwarz et décoloration de la bande en milieu acide acétique-méthanol (1 volume pour 9 volumes).

Nous avons voulu nous mettre dans des conditions dénaturantes, afin d'observer le changement produit en électrophorèse. Nous avons introduit à cet effet des quantités croissantes de solutions toluéniques de benzo (a) pyrène dans une solution d'albumine, comprenant deux ml de milieu aqueux tamponné et trois ml de chloro-2 éthanol. On voit sur la figure 16 qu'un second pic apparaît sur la bande d'électrophorèse lorsque la solution contient plus de 500 µl de toluène.

L'importance de ce pic supplémentaire croît avec la concentration en toluène, il est certainement dû à une espèce dégradée de la protéine.

Par contre, on observe bien que cette dégradation ne se manifeste pas quand une quantité de solution toluénique inférieure à 150 µl est introduite dans la solution initiale de protéine.

III-2-5) Immunodiffusion et immunoélectrophorèse

Immunodiffusion

Nous avons pu obtenir des anticorps d'albumine de sérum de boeuf par inoculation de cette protéine à des lapins (fauves de bourgogne).

Nos animaux étaient hébergés dans l'animalerie de Monsieur le professeur Pautrizel de l'unité INSERM n° 58, et son collaborateur, Monsieur Capbern a bien voulu se charger de l'inoculation.

La préparation de l'immun-sérum des lapins a été effectuée par Bernon, dans notre centre.

1ère injection : 5 mg d'albumine de sérum de boeuf en présence de l'adjuvant de Freud (sous-cutanée),

2ème injection : le 60ème jour : 2 mg de protéine en solution physiologique sans adjuvant et injection intramusculaire,

3ème injection : le 61ème jour : intraveineuse (1 mg),

4ème injection : le 62ème jour : intraveineuse (1 mg),

5ème injection : le 69ème jour : intramusculaire (2 mg),

6ème injection : le 70ème jour : intraveineuse (1 mg),

7ème injection : le 71ème jour : intraveineuse (1 mg).

La saignée est effectuée au 79ème jour suivant la première injection.

Après coagulation du sang, puis centrifugation, l'anti-sérum d'albumine est obtenu.

Les expériences d'immunodiffusion ont été réalisées sur gel d'agar-agar, à 1 %, dont le gonflement s'effectue par ébullition au bain-marie, en milieu tampon (véronal de sodium : 10, 3 g ; HCl 1N : 16, 25 ml pour 1 litre d'eau).

L'immunoélectrophorèse comprend une électrophorèse suivie d'une immunodiffusion.

Ces deux techniques ont donné des résultats identiques, que la solution contienne l'albumine originelle ou l'albumine traitée, renfermant le benzo (a) pyrène (voir figure 17).

Là encore, il n'apparait pas que la protéine soit dénaturée par le traitement que nous lui faisons subir, ni même quand elle a fixé plusieurs molécules d'hydrocarbure.

Remarquons cependant que notre immun-sérum contient un spectre d'anticorps de l'albumine et qu'on ne peut pas espérer détecter ainsi une modification très locale de la structure secondaire de la protéine n'intéressant que quelques séquences courtes polypeptidiques, si elle a lieu.

III-2-6) Dispersion optique rotatoire (O.R.D.)

Nous avons enfin étudié la dispersion optique rotatoire de nos solutions à l'aide de l'appareil Fica du laboratoire du professeur Creac'h. Les spectres de cinq solutions ont été enregistrés. Les caractéristiques de celles-ci sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

Solution (n°)	ClE	Toluène	Nombre de lyophilisations	Nombre de filtrations
1	0	0	0	0
2	0	0	0	1
3	0	0	4	1
4	3 ml	0	4	1
5	3 ml	50 µl	4	1

Figure 17 Immunodiffusion et Immunoélectrophorèse

I/Immunodiffusion : a) Partie supérieure : protéine non traitée ; Partie inférieure : solution du complexe BP-BSA ($\bar{\nu}$=2,7).

b) solution du complexe BP-BSA ($\bar{\nu}$ = 2,63) dépôt inférieur droit - comparée à une solution BSA sans BP ayant subi 4 lyophilisations et 1 filtration - dépôt inférieur gauche -, et à une solution commerciale de BSA à la même concentration - dépôts supérieurs droite et gauche.

II/Immunoélectrophorèse : Solution du complexe BP-BSA ($\bar{\nu}$ = 7,8) - à droite - comparée à une solution commerciale de BSA à la même concentration - dépôt à gauche.

Toutes contiennent 2 ml de solution tamponnée de BSA (1 mg/ml). Aucune ne comporte l'hydrocarbure aromatique, celui-ci perturbant totalement le spectre d'O.R.D. par sa propre absorption.

Les cinq spectres obtenus ainsi sont confondus, aux erreurs expérimentales près (voir figure 18). A l'aide de l'équation de Moffitt (19), nous avons calculé les pourcentages de structure hélicoïdale, α (45%), en feuillets, β (4 %) et en pelote statistique (51 %). Ces chiffres sont en accord avec ceux de la littérature, pour l'albumine de sérum de boeuf (20).

Par contre, une solution de BSA comportant 3 ml de chloro-2 éthanol et 2 ml de tampon présente un spectre différent. Le pourcentage d'hélicité est nettement supérieur (61 %), conformément à ce qui a déjà été observé avec des protéines membranaires de globules rouges mises en présence de chloro-2 éthanol (10).

Ces résultats nous montrent que notre intermédiaire organique, le chloro-2 éthanol, agit sur la structure secondaire de l'albumine (en la renforçant d'ailleurs), ce qui peut entraîner l'accessibilité de sites internes de fixation de l'hydrocarbure aromatique. Mais une fois chassé le chloro-2 éthanol par lyophilisation, la protéine retrouve sa structure originelle.

III-3) Contrôle de la fixation de l'hydrocarbure sur la protéine

Quand le taux de fixation $\bar{\nu}$ est élevé, la solution prend un aspect légèrement colloïdal : une lumière diffusée, relativement intense, apparaît. Puisque les protéines ne sont pas en cause, comme le montrent les expériences précédentes, on pourrait se demander si l'hydrocarbure ne se trouve pas dispersé en microcristaux dans la solution et non pas fixé aux protéines. Pour vérifier ce point, nous avons fait les expériences suivantes :

a) du benzo (a) pyrène cristallisé est dispersé par ultra-sons dans 2 ml de tampon. La suspension est filtrée sur la colonne de séphadex G 50, utilisée dans nos expériences de fixation (voir figure 19).

Les fractions recueillies après filtration sont analysées par spectrométrie ultra-violette. Aucune absorption n'apparaît à la longueur d'onde caractéristique du benzo (a) pyrène. Des microcristaux de benzo (a) pyrène en suspension ne traverseraient donc pas la colonne de filtration.

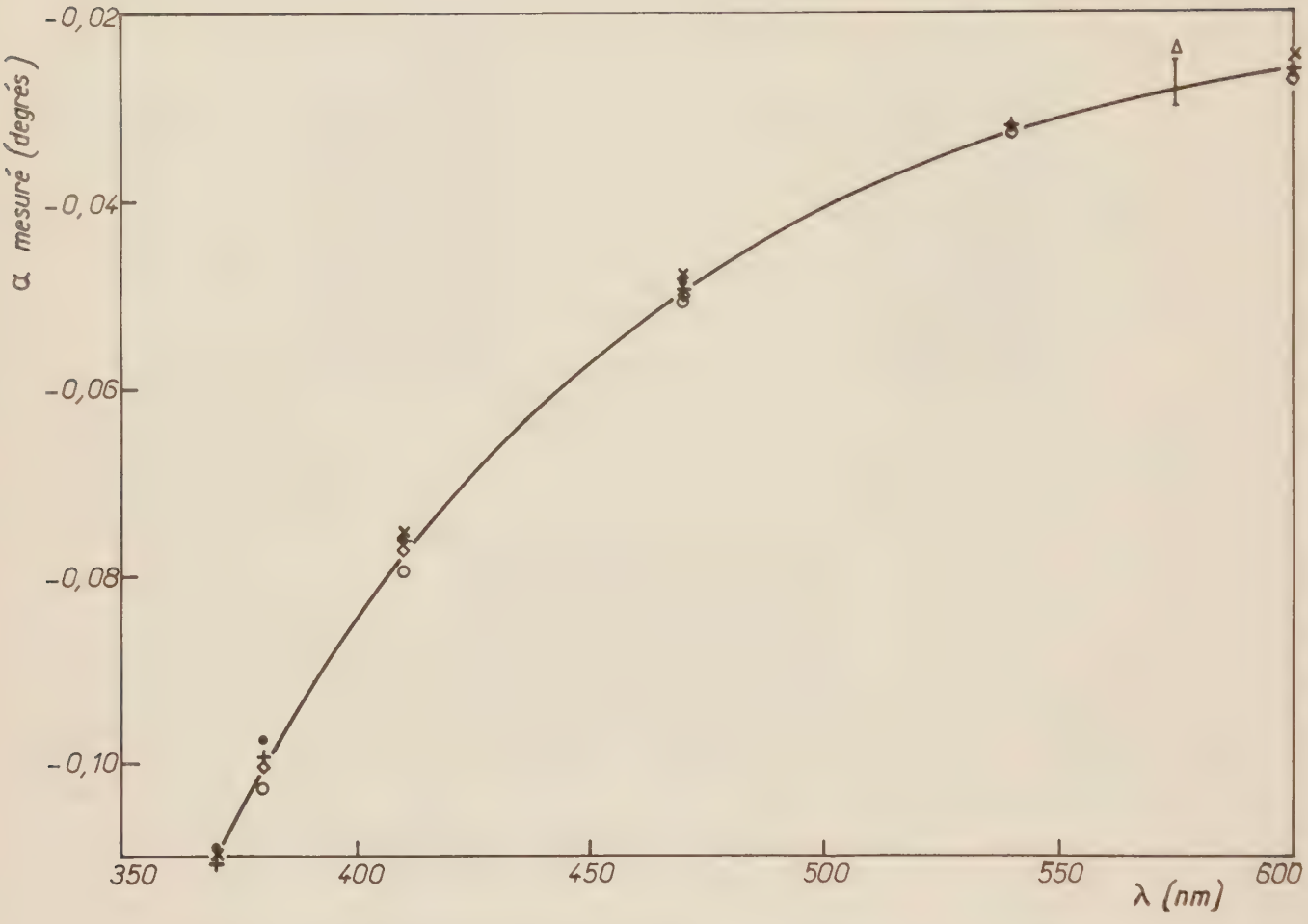


Figure 18 Dispersion Optique Rotatoire de solutions aqueuses Tamponnées de BSA (O.R.D.)
(C = 1 mg/ml). P_M = 7,8 ; force ionique 0,145 M NaCl

x Solution de BSA commerciale

0 Solution de BSA 1 filtration sur Séphadex G 50

◇ Solution de BSA 4 Lyophilisations,1 filtration sur Séphadex G 50

. Solution de BSA + Chloro-2 éthanol (3 ml), 4 lyophilisations, 1 filtration sur séphadex G 50.

+ Solution de BSA + Chloro-2 éthanol (3 ml), + Toluène (50 l), 4 Lyophilisations, 1 filtration sur séphadex G 50

Le tiret vertical (Δ) représente l'incertitude expérimentale sur x.

b) Nous avons répété cette opération en saturant le gel de la colonne avec du benzo (a) pyrène cristallisé, dispersé par ultra-sons.

Après élution, les fractions recueillies ne présentent encore aucune absorption ultra-violette caractéristique du benzo (a) pyrène.

c) L'absorption ultra-violette n'étant pas une technique très sensible, nous avons fait de nouveaux tests en utilisant du benzo (a) pyrène tritié et en le détectant par comptage en scintillation.

Des solutions aqueuses tamponnées, contenant du chloro-2 éthanol et du benzo (a) pyrène dans le toluène sont lyophilisées dans les conditions initiales habituelles mais sans protéine.

Trois solutions sont ainsi préparées, comportant au départ 20 à 50 µl de solution toluénique de benzo (a) pyrène marqué.

Après filtration sur la colonne de gel séphadex 50, aucune radioactivité n'est décelée (le nombre de désintégrations mesuré par minute est égal à celui qu'on observe pour la verrerie décontaminée).

d) Nous avons comparé les activités obtenues en filtrant la même solution de complexe benzo (a) pyrène -albumine de sérum de boeuf sur une colonne de gel vierge et sur une colonne ayant déjà servi à la filtration de plusieurs solutions de complexe. Nous avons obtenu les mêmes résultats expérimentaux dans les deux cas.

Nous concluons que l'hydrocarbure qui apparaît dans nos solutions après filtration sur gel séphadex G 50 est bien fixé sur les protéines, et non dispersé en microcristaux, ou dissous dans l'eau. La colonne de gel utilisée retient parfaitement l'hydrocarbure libre.

Remarque

Nous avons essayé deux autres techniques pour séparer l'hydrocarbure en excès du complexe benzo (a) pyrène -albumine de sérum de boeuf :

la filtration de la solution sur verre fritté de porosité G4 et G5, et la centrifugation.

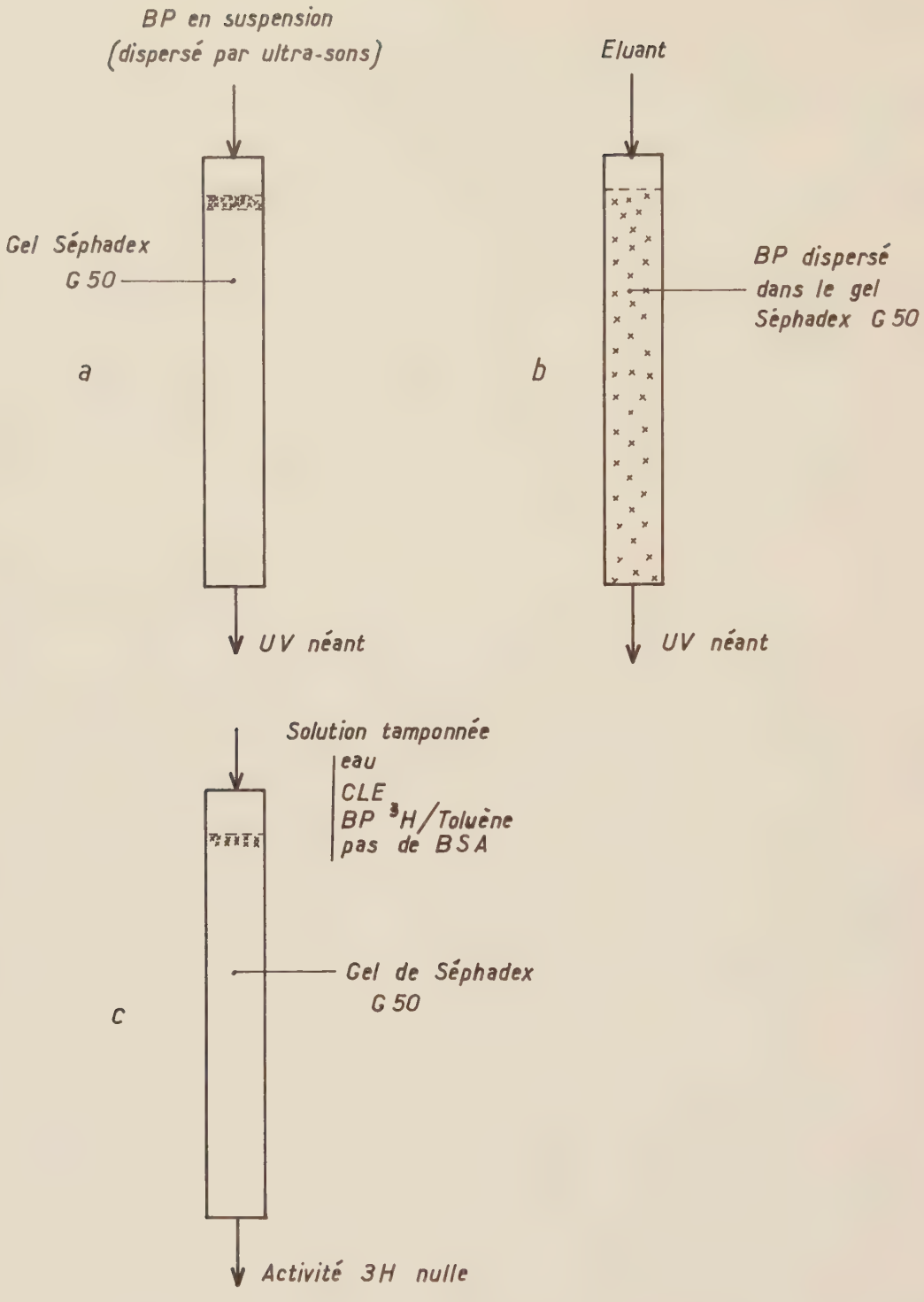


Figure 19 : Contrôle de la fixation de l'hydrocarburé sur la protéine

Dans le premier cas, la protéine est en partie dénaturée lors de son passage sur le verre fritté et le complexe reste en partie sur le filtre.

Dans le deuxième cas, la centrifugation permet de séparer le surnageant, léger, d'une phase plus lourde ; mais le mélange rapide de ces deux phases rend le prélèvement du surnageant très délicat.

III-4) Contrôle du marquage radioactif

On sait que des composés organiques tritiés perdent parfois leur tritium en milieu aqueux par échange avec l'hydrogène léger.

Bien que le benzo (a) pyrène ne comporte pas d'hydrogène labile, nous avons voulu nous assurer qu'il n'y avait pas perte de tritium au cours du traitement.

Dans ce but, nous avons mélangé des échantillons de benzo (a) pyrène marqués l'un au tritium, l'autre au carbone 14. Le dosage indépendant des activités de ces deux isotopes a conduit aux mêmes valeurs de $\bar{\nu}$, comme on peut le voir sur les figures 6, 9 et 10.

Le tritium est donc bien fortement fixé sur le benzo (a) pyrène. Nous en avons eu une autre preuve. Lors du marquage de nos échantillons, dans le laboratoire du C.E.A. (Saclay), le pourcentage de tritium labile, extrait après l'opération avec des solvants polaires est pratiquement nul.

III-5) Contrôle de l'action du chloro-2 éthanol

Nous avons vérifié qu'avec le même protocole expérimental, mais sans chloro-2 éthanol, la fixation de l'hydrocarbure sur la protéine ne se produit pas, aucune radioactivité n'apparaît après filtration sur gel.

Par contre, nous avons pu faire varier fortement la quantité de chloro-2 éthanol (de 1 à 15 ml) sans perturber les taux de fixation $\bar{\nu}$ obtenus.

Nous avons cherché à analyser l'environnement des molécules de benzo (a) pyrène dans les diverses phases du traitement. Nous verrons dans le paragraphe suivant que le spectre d'absorption du benzo (a) pyrène fixé sur la

protéine se distingue de celui qu'on obtient en milieu organique simple (hydro-alcoolique par exemple).

En conséquence, nous avons étudié le spectre d'absorption dans l'ultra-violet du benzo (a) pyrène, dans trois solutions :

a) 2 ml de tampon ; 3 ml de chloro-2 éthanol ; 50 µl de solution toluénique de benzo (a) pyrène.

Le spectre d'absorption qu'on enregistre est celui du benzo (a) pyrène en solution hydro-alcoolique. L'hydrocarbure se trouve donc simplement dissous dans le milieu tamponné.

b) Même solution que a), plus 5 mg d'albumine de sérum de boeuf.

Le spectre est le même que précédemment. Il diffère suffisamment de celui du complexe benzo (a) pyrène -albumine de sérum de boeuf pour qu'on puisse en déduire que le benzo (a) pyrène n'est pas encore fixé sur la protéine.

Si l'on filtre cette solution sur gel, le benzo (a) pyrène étant tritié, on ne retrouve aucune radioactivité dans les fractions recueillies contenant la protéine.

Nous en concluons que le chloro-2 éthanol est absolument nécessaire, mais que la fixation du benzo (a) pyrène sur la protéine n'a lieu qu'au cours des lyophilisations.

III-6) Elimination du toluène

Il fallait aussi vérifier que le toluène introduit avec le BP était bien éliminé par les lyophilisations. Sinon, il aurait pu entrer en compétition avec l'hydrocarbure polycyclique, lors de sa fixation sur les sites protéiques.

A cet effet, nous avons utilisé du toluène tritié. Deux solutions de protéine dans le tampon (2 ml ; concentration 2, 5 mg/l) contenant également du chloro-2 éthanol (3 ml) sont lyophilisées quatre fois, dans les conditions habituelles. L'une contient en plus du BP. Après reprise du dernier lyophilisat par l'eau, les solutions sont traitées pour comptage par scintillation. Aucune radioactivité n'est décelée. Il n'y a donc plus de toluène dans la solution lyophilisée.

PROPRIETES SPECTRALES DE L'HYDROCARBURE FIXE DANS LA PROTEINE (BP - BSA)

Nous avons étudié les spectres d'absorption et de fluorescence des solutions de complexe benzo (a) pyrène -albumine de sérum de boeuf.

Ces spectres étant sensibles à l'environnement de la molécule étudiée, ici le benzo (a) pyrène, nous pouvions espérer acquerrir ainsi des informations sur la situation de l'hydrocarbure dans la protéine.

IV-1) Les spectres d'absorption dans l'ultra-violet.

Le benzo (a) pyrène présente dans le très proche ultra-violet des bandes d'absorption de structure fine. Nous avons enregistré quelques spectres dans des solvants organiques simples (voir figures 20 et 21).

Bien que tous ces spectres aient la même allure, on remarque que le maximum d'absorption se situe à 388 nm dans les solvants aromatiques (benzène, toluène, mais aussi phénol et indole), et à 383 nm dans les solvants aliphatiques ou polaires (alcanes, acide acétique, alcool éthylique).

Nous avons également déterminé les coefficients d'extinction moléculaires ε dans ces divers solvants, après avoir contrôlé la validité de la loi de Beer-Lambert (voir tableau 18). On voit encore une différence : dans les solvants aromatiques ε est systématiquement plus faible que dans les autres solvants.

Nous avons enregistré les spectres d'absorption des solutions de complexe benzo(a) pyrène - albumine de sérum de boeuf (voir figure 22). La diffusion de la solution perturbe l'enregistrement des spectres, tout particulièrement quand le taux de fixation $\bar{\nu}$ est élevé. On retrouve cependant deux

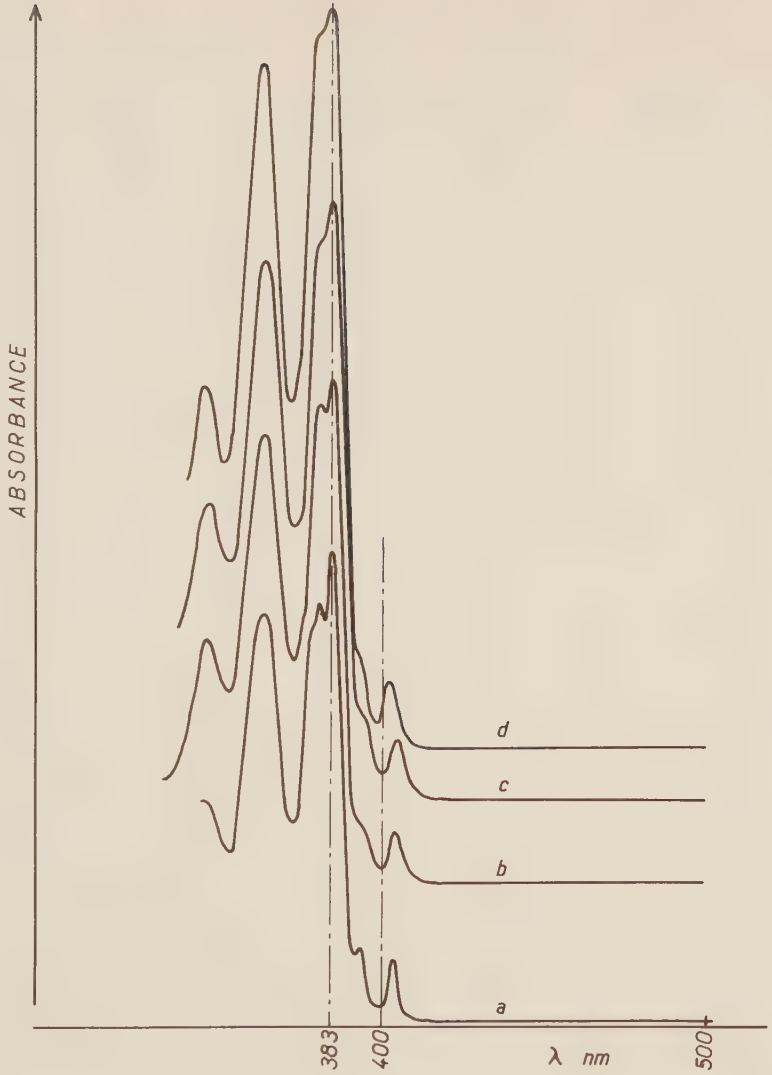


Figure 20 Spectres d'absorption du Benzo (a) pyrène dans les solvants aliphatiques

a) Dans l'heptane

b) Dans l'isopentane

c) Dans le diméthyl - 2, 4 - pentane

d) Dans le pentane

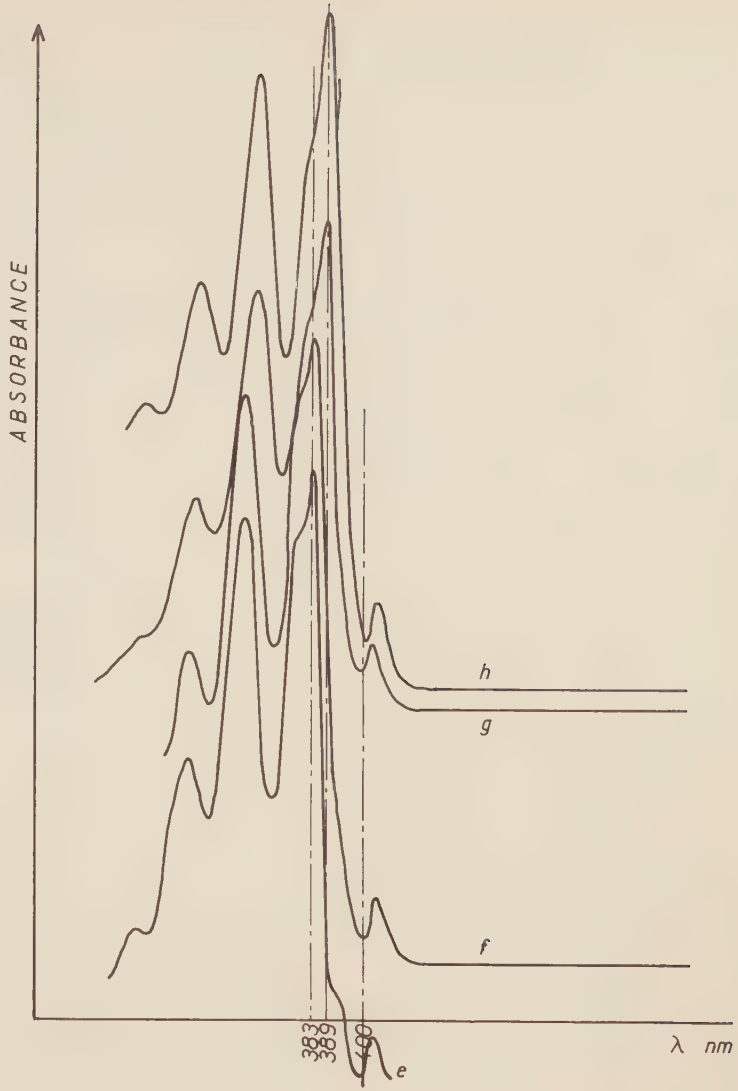


Figure 21 Absorption du Benzo (a) pyrène en solution

c) dans l'alcool éthylique

f) dans l'acide acétique

g) dans le benzène

h) dans le Toluène

TABLEAU 18

Solvant Aromatique	λ observation nm	ε ($mole^{-1}.L.cm^{-1}$)
Toluène	388	22 200 ± 500
Benzène	388	19 900 ± 1 000
Indole	388	17 000 ± 2 000 (t = 69° C)
Phénol	388	18 300 ± 2000 (t = 54° C)
Solvant Aliphatique	**λ observation nm**	**ε ($mole^{-1}.L.cm^{-1}$)**
Pentane	382, 5	24 500 ± 1 700
Heptane	383	24 400 ± 700
Diméthyl-2, 4-Pentane	383	25 700 ± 700
Isopentane	383	26 100 ± 800
Acide acétique	384	24 400 ± 1 000
Alcool éthylique	384	26 400 ± 1 400

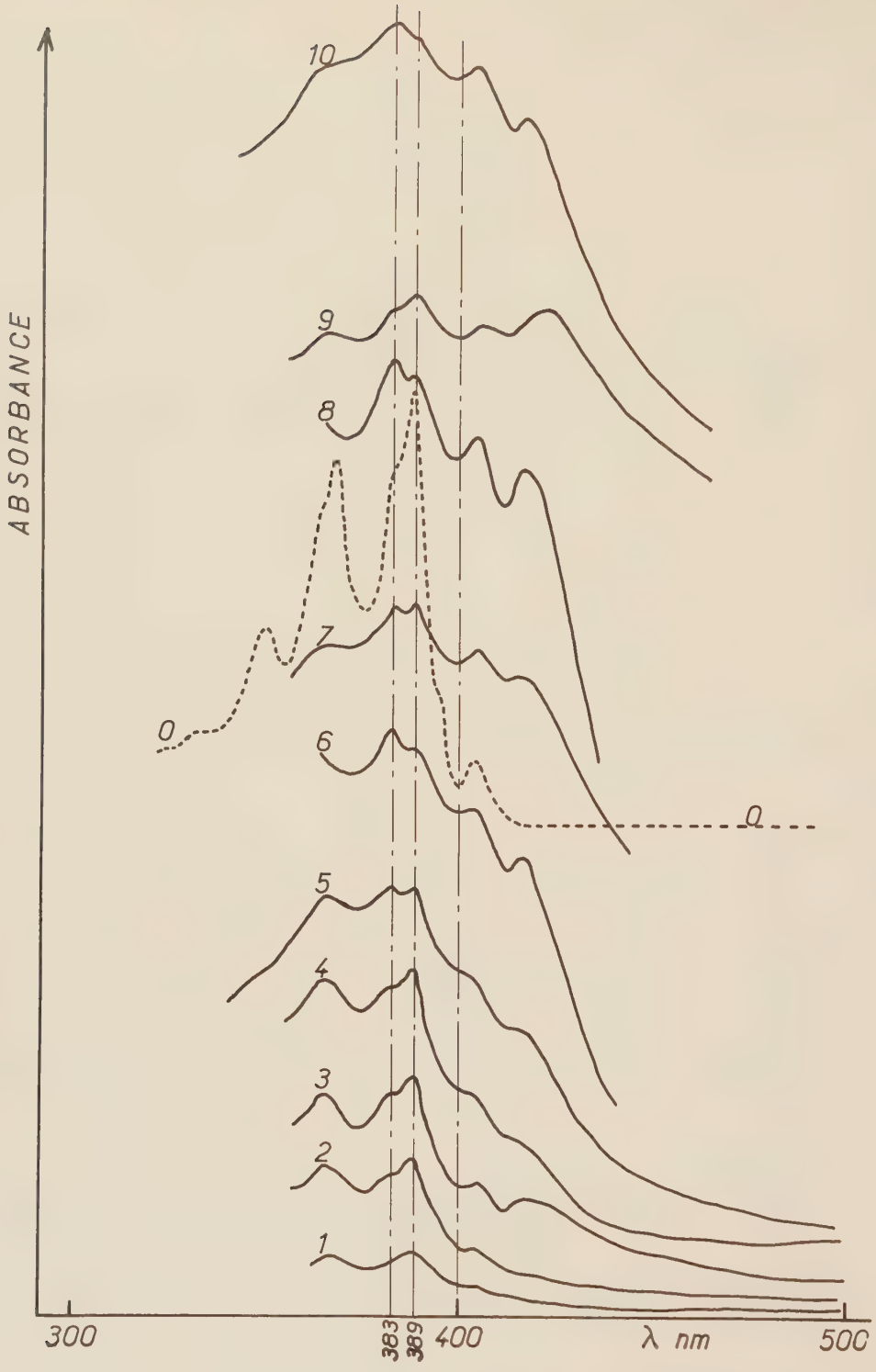


Figure 22 Spectres d'absorption du Benzo (a) pyrène dans la BSA (t = 22°C, Cary 16 sensibilité 0-0, 5).

0 dans le Toluène

1 $\bar{\nu}$ = 0, 080	6 $\bar{\nu}$ = 2, 00
2 $\bar{\nu}$ = 0, 15	7 $\bar{\nu}$ = 2, 70
3 $\bar{\nu}$ = 0, 40	8 $\bar{\nu}$ = 3, 40
4 $\bar{\nu}$ = 0, 60	9 $\bar{\nu}$ = 4, 10
5 $\bar{\nu}$ = 1, 00	10 $\bar{\nu}$ = 4, 60

bandes d'absorption à 365 et 389 nm pour les valeurs faibles de $\bar{\nu}$. Puis, $\bar{\nu}$ croissant, une nouvelle bande assez large apparaît à 420 nm. L'intensité de cette bande est plus importante pour les valeurs élevées de $\bar{\nu}$ (la diffusion nous empêche d'observer si cette intensité croît régulièrement avec $\bar{\nu}$).

On observe également que l'épaulement primitif, à 383 nm qu'on observe sur la bande en début de fixation voit son intensité augmenter avec $\bar{\nu}$ et dépasser celle du maximum primitif, situé à 389 nm.

Nous avons pu déterminer le coefficient d'extinction moléculaire $\mathcal{E}$ du benzo (a) pyrène dans l'albumine, à faible taux de fixation ($\bar{\nu} < 0,1$). Dans ces conditions, le spectre ressemble tout à fait à celui d'une solution organique et la diffusion ne gêne pas la mesure de l'absorbance. Nous avons déterminé la concentration en benzo (a) pyrène par comptage de l'activité de la molécule tritiée et déterminé ainsi la valeur de $\mathcal{E} = 13\,000 \pm 2000$ mole^{-1}. l. cm^{-1}.

Une première remarque peut être faite : tant que la quantité d'hydrocarbure fixé sur la protéine reste faible ($\bar{\nu} \ll 1$), le spectre ultra-violet est très voisin de celui du benzo (a) pyrène dans un solvant aromatique ($\bar{\nu}_{max} = 388 - 385$ nm ; $\mathcal{E} < 20\,000$ mole^{-1}. l. cm^{-1}).

On peut même noter que cette analogie est plus grande avec le phénol et l'indole qu'avec le benzène et le toluène.

On peut y voir l'indice d'un environnement semblable de la molécule de benzo (a) pyrène dans l'albumine et dans un de ces solvants aromatiques. Ce serait le cas si le benzo (a) pyrène était fixé sur la chaîne latérale d'un résidu tryptophane (indole) ou tyrosine (phénol).

Cette hypothèse est fort plausible. Le tryptophane semble être ou se trouver très près du site de fixation de nombreuses molécules transportées par les albumines. C'est le cas, par exemple, de plusieurs stéroïdes fixés sur la HSA (21). On observe également que le spectre de fluorescence du tryptophane est perturbé quand la BSA complexe des détergents (22).

On connait d'ailleurs l'environnement du tryptophane dans nos deux albumines. La nature des résidus voisins a été déterminée des deux côtés du seul résidu tryptophane de la HSA (23) :

... Lysine-Alanine-Tryptophane-Alanine-Valine-Alanine-Arginine...

et d'un côté seulement pour les deux tryptophanes de la BSA (24) :

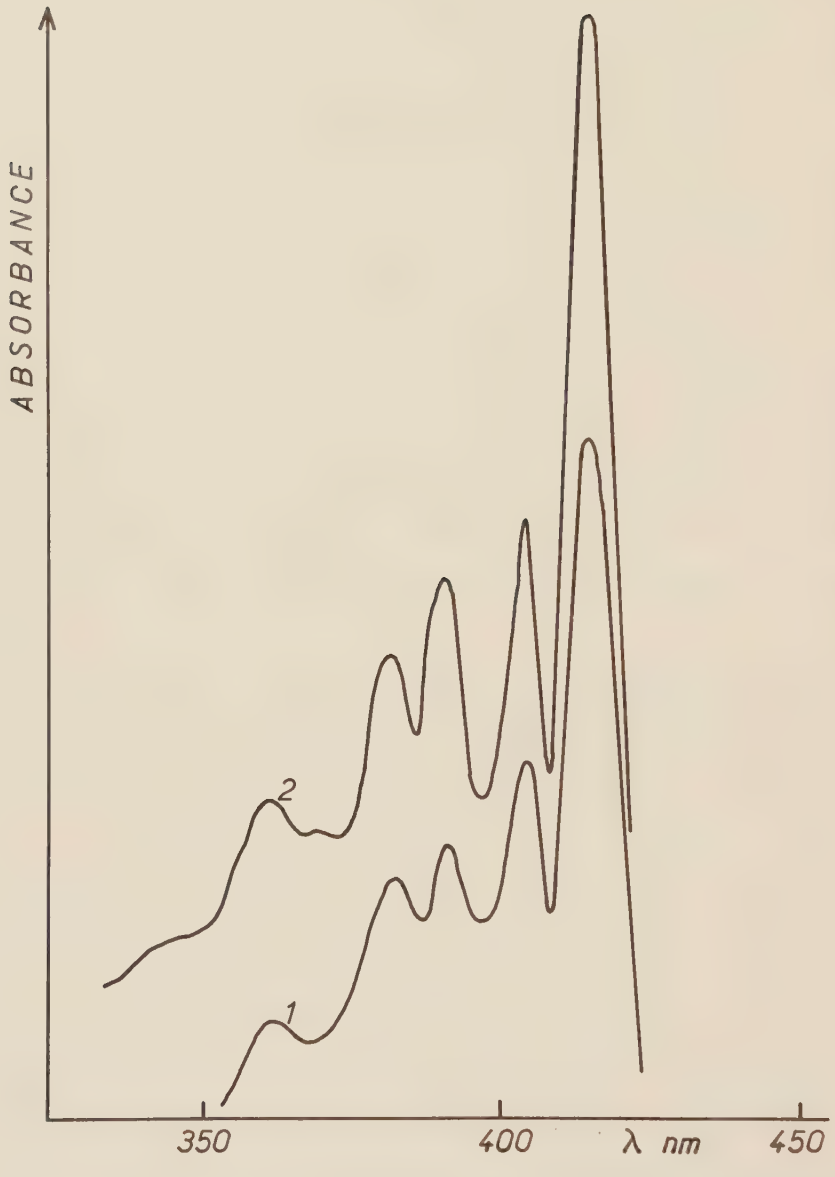


Figure 23 Spectres d'absorption du Benzo (a) Pyrène sublimé sur face de quartz (Cary 14).

1 - Température ambiante

2 - A 80°K

I - ... Tryptophane-Sérine-Valine-Alanine (Glycine, Alanine) ...

2 - ... Tryptophane-Glycine-Phénylalanine-Leucine ...

Les voisins immédiats de ces résidus tryptophanes sont non polaires dans les deux cas (HSA et BSA n° 2), et doivent favoriser une interaction "hydrophobe" (forces de London) avec le BP.

Il est probable que le résidu tryptophane de la HSA soit extérieur, en contact avec le milieu aqueux (23). S'il se trouve effectivement près du site accepteur du BP dans la HSA, il est logique de penser que l'un des deux résidus tryptophanes de la BSA a un environnement analogue, puisque nous observons des taux de fixation voisins du BP dans ces deux albumines. Ceci expliquerait que ce site pourrait déjà être atteint par simple dissolution du BP en milieu aqueux, sans intermédiaire organique.

Mais à quoi serait due la modification du spectre, quand $\bar{\nu}$ croît ? et en particulier la bande nouvelle à 420 nm ?

Nous nous sommes demandés si cette bande, large, décalée vers les plus grandes longueurs d'onde par rapport à la précédente, était due à un agglomérat de molécules de benzo (a) pyrène, enfermé dans la protéine.

Pour tenter de répondre à cette question, Lamotte a enregistré au laboratoire de chimie physique, le spectre d'absorption du benzo (a) pyrène sublimé (voir figure 23). On voit effectivement apparaître une bande, entre 380 et 430 nm, qu'on attribue à des molécules agglomérées d'une manière plus ou moins ordonnée.

Des expériences préliminaires faites en milieu vitreux, méthylcyclopentane-méthylcyclohexane, au laboratoire d'optique moléculaire, ont également fait apparaître une nouvelle bande aux grandes longueurs d'onde attribuable à des agrégats.

En conclusion, l'étude des bandes d'absorption ultra-violettes du benzo (a) pyrène en solution dans la BSA et dans des milieux modèles nous conduit à imaginer deux sites possibles du BP dans la BSA :

- l'un où une molécule seulement viendrait se fixer, probablement contre un résidu tryptophane,

Figure 24 **Spectres d'émission de fluorescence du Benzo (a) pyrène dans le Toluène** et dans la BSA (t = 22°C) (I_F = intensité de fluorescence).

λ excitation = 386 nm

1 - dans le Toluène (C = 210^{-5} M/l), sensibilité = 1

2 - dans la BSA $\bar{\nu}$ = 0, 87 sensibilité = 30

3 - dans la BSA $\bar{\nu}$ = 2, 90 sensibilité = 30

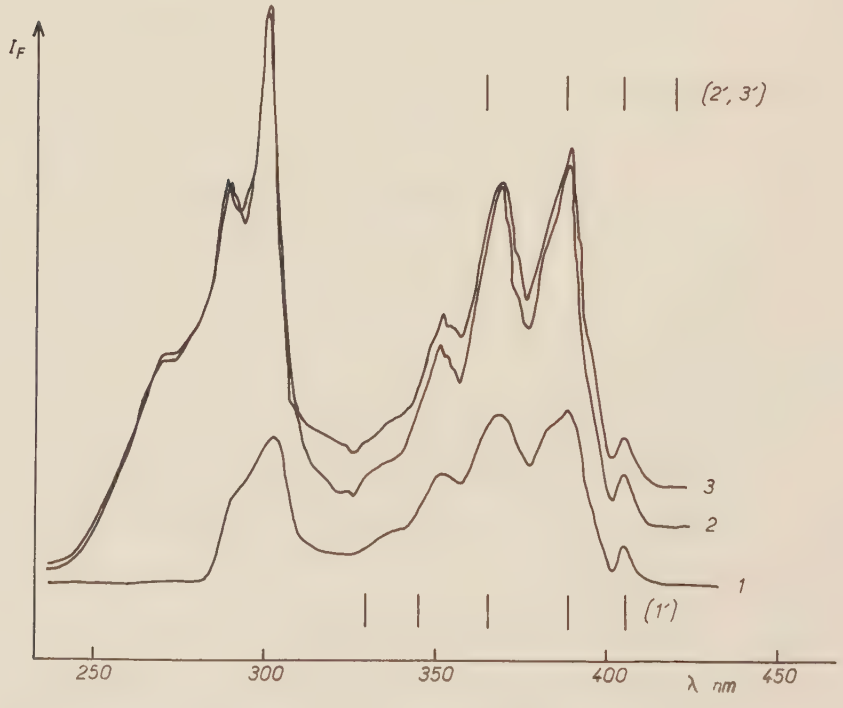


Figure 25 Spectres d'excitation de fluorescence du Benzo (a) pyrène dans le Toluène et dans la BSA (t = 22°C).

λ observation = 430 nm

1 dans le Toluène (C = 210^{-5} M/l) sensibilité 1 :

1' repérage du maximum des bandes d'absorption du BP dans le Toluène

2 dans la BSA $\bar{\nu}$ = 0, 87 sensibilité 30

(2', 3') repérage du maximum des bandes d'absorption du BP dans la BSA.

- l'autre, moins défini, pourrait contenir un nombre variable de molécules, croissant avec $\bar{\nu}$.

Le premier site ne peut contenir qu'une seule molécule, car même le dimère présenterait un déplacement des pics d'absorption vers les grandes longueurs d'onde. Ces deux sites ne sont probablement pas confondus, puisque le pic d'absorption correspondant au premier à 389 nm, persiste sur tous les spectres, même lorsque $\bar{\nu}$ est très élevé. Ce ne serait certainement pas le cas si un seul site se garnissait régulièrement de benzo (a) pyrène, jusqu'à compter 10 molécules.

Il est évident que cette interprétation repose sur des bases qu'on souhaiterait plus solides, la structure des bandes d'absorption observées n'étant pas toujours d'une grande finesse.

C'est pourquoi, nous avons recherché de nouvelles informations expérimentales dans les spectres de fluorescence de nos solutions.

IV-2) Les spectres de fluorescence

Ces expériences ont été faites dans les laboratoires de Messieurs les professeurs Creac'h (spectrophotomètre Fica), Neuzil (spectrophotomètre Perkin-Elmer) et, plus récemment avec l'appareil de l'unité de chimie (Perkin-Elmer). Cette étude spectrométrique est faite en collaboration très étroite avec Monsieur Ewald et Monsieur le professeur Joussot-Dubien.

Nous avons tout d'abord enregistré les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence du benzo (a) pyrène en solution dans le toluène (voir figures 24 et 25, courbe 1). Nous avons reporté sur la figure 25 les longueurs d'onde d'absorption maximales. A la précision de la comparaison entre les spectres d'absorption ultra-violette et d'excitation, on voit sur cette dernière figure que les bandes caractéristiques se situent bien aux mêmes longueurs d'onde dans ces deux spectres. La fluorescence observée est donc celle du benzo(a) pyrène, et pas celle d'une impureté.

Nous avons enregistré ensuite les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence des solutions de complexe BP - BSA, en fonction de $\bar{\nu}$.

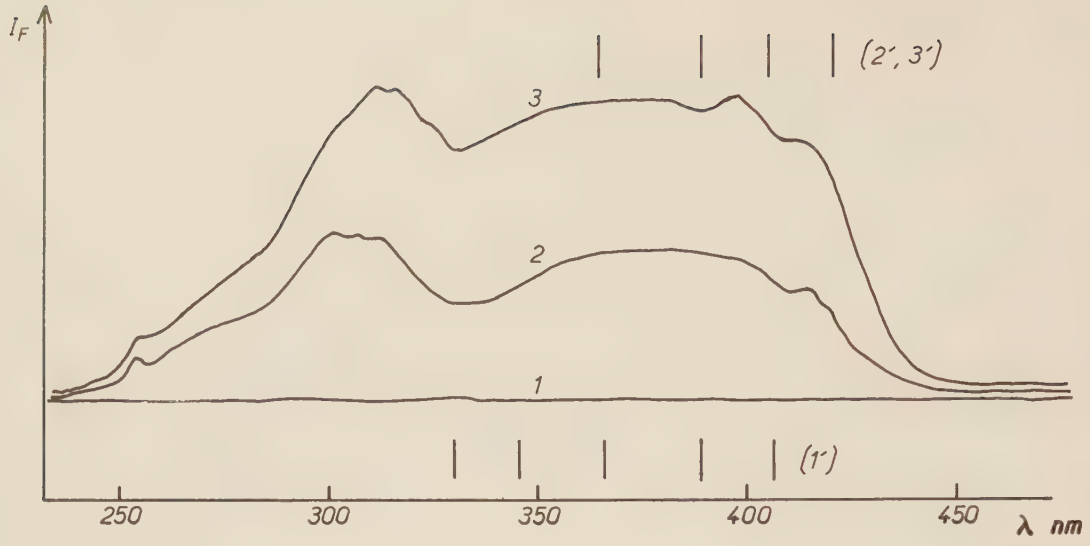


Figure 26 Spectres d'excitation de fluorescence du Benzo (a) pyrène dans le Toluène et dans la BSA (t = 22°C).

λ observation = 505 nm

1 - dans le Toluène (C = 210^{-5} M/1) sensibilité 100

(1') repérage du maximum des bandes d'absorption du BP dans le Toluène

2 - dans la BSA $\bar{\nu}$ = 0, 87 sensibilité 30

(2', 3') repérage du maximum des bandes d'absorption du BP dans la BSA

3 - dans la BSA $\bar{\nu}$ = 2, 90 sensibilité 30

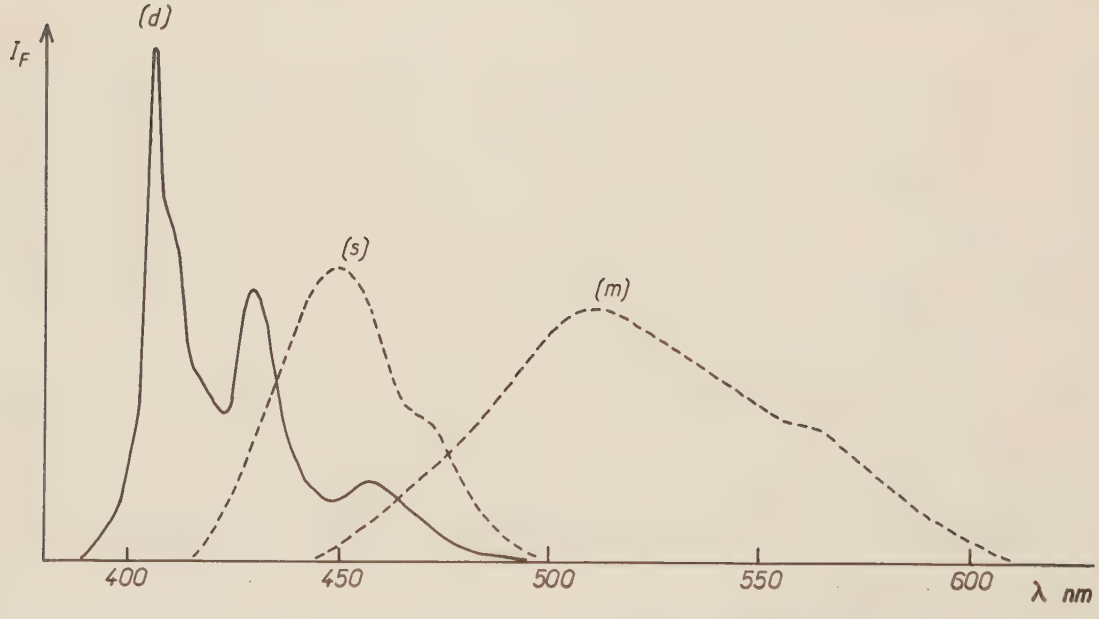


Figure 27 Spectres d'émission de fluorescence du Benzo (a) pyrène selon STEVENS

d) en solution dans l'Ethanol

s) cristal sublimé

n) cristal monoclinique

Nous avons représenté deux résultats, à titre d'exemple sur les figures 24 et 25 ($\bar{\nu}$ = 0, 87 ; $\bar{\nu}$ = 2, 9). On retrouve encore dans le spectre d'excitation de ces solutions des bandes caractéristiques, aux mêmes longueurs d'onde que dans le spectre d'absorption.

Le spectre d'émission de fluorescence entre 390 et 470 nm du benzo (a) pyrène dans la protéine est superposable à celui du BP en solution dans le toluène.

Par contre, une émission nouvelle apparaît entre 480 et 530 nm, avec un maximum aplati. Cette bande augmente d'intensité avec $\bar{\nu}$ et n'est pas structurée. Le spectre d'excitation correspondant (voir figure 26 ; longueur d'onde d'observation : 505 nm) ne présente pas non plus de structure fine.

On observe donc une analogie profonde entre les spectres de fluorescence et d'absorption des solutions du complexe BP - BSA : un premier massif, très structuré, tout à fait analogue à celui que présente le benzo (a) pyrène dans le toluène, un second massif, informe, à plus grande longueur d'onde, croissant avec $\bar{\nu}$.

Là encore, en analysant les analogies et les différences avec les solutions dans le toluène le premier massif pourrait être attribué à un site monomère, d'environnement aromatique, le second à un agglomérat polymère, croissant avec $\bar{\nu}$.

Une preuve expérimentale de l'origine de la bande non structurée à 505 nm peut être recherchée dans les résultats de Stevens (25) qui a étudié les spectres d'émission de fluorescence du benzo (a) pyrène sublimé et cristallisé (voir figure 27). Le monocristal monoclinique présente vers 500 nm une bande d'émission non structurée, large, tout à fait semblable à celle que nous observons avec le benzo (a) pyrène fixé sur l'albumine. Cette absence de structure est attribuée à la formation d'excimères*, favorisée dans un milieu très ordonnée. Des agrégats, dans lesquels les molécules

---

* L'émission de fluorescence dite de "l'excimère" est attribuée à l'émission du complexe formé lors de l'association d'une molécule excitée dans le premier état singulet ($^1M^*$) et d'une molécule à l'état fondamental (^1M) pour donner un "dimère excité" qui se dissocie lors du retour à l'état fondamental

$$^1M^* + {}^1M \longrightarrow {}^1(MM^*)$$

$$^1(MM)^* \longrightarrow {}^1M + {}^1M + h\nu_F \quad \text{excimère}$$

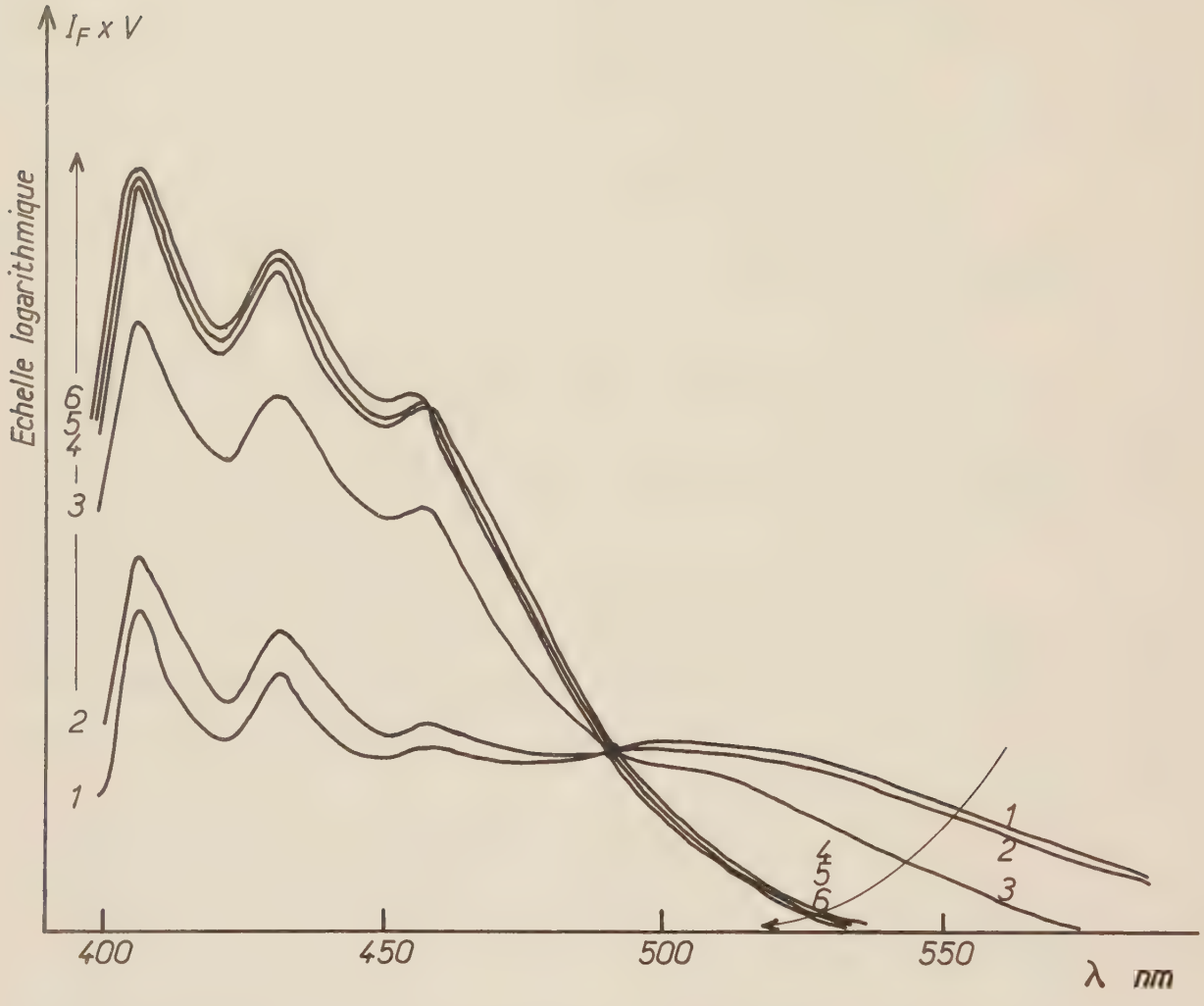


Figure 28 Spectres d'émission de fluorescence (λ excitation = 386 nm, t = 22°C)
Extraction du BP fixé à la BSA par le chloro-2 éthanol

1 - Solution du complexe BP-BSA (V = 1, 5 ml, C_{BSA} = 0, 59 mg/ml, $\bar{\nu}$ = 0, 59).

2 - + 200 l de chloro-2 éthanol (V = 1, 7 ml)

3 - + 200 l de chloro-2 éthanol (V = 1, 9 ml)

4 - + 200 l de chloro-2 éthanol (V = 2, 1 ml)

5 - + 200 l de chloro-2 éthanol (V = 2, 3 ml)

6 - + 400 l de chloro-2 éthanol (V = 2, 7 ml)

pour étudier sur la même figure, sans changement d'ordonnée toutes les solutions étudiées, nous avons pris une échelle logarithmique. Nous avons choisi comme ordonnée le produit de l'intensité de fluorescence I_F par le volume V de la solution pour neutraliser l'effet de dilution quand est ajouté le chloro-2 éthanol.

sont moins ordonnées que dans le cristal peuvent être obtenus par sublimation. Ils présentent une bande d'émission intermédiaire entre celle du cristal et celle du monomère.

Tout comme en absorption, le pic attribuable au site monomère dans les spectres d'émission de nos solutions ne disparaît pas quand la bande correspondant au polymère se développe.

Son intensité reste même apparemment constante, quand ν varie de 0,1 à 8. Il semblerait que le site monomère soit très vite saturé, pour des valeurs faibles de $\bar{\nu}_o$, puis n'évolue plus quand d'autres molécules de benzo (a) pyrène s'introduisent dans la protéine.

Ce faible taux de fixation sur le site monomère peut s'expliquer s'il est bien situé sur le résidu tryptophane. En effet, certains résidus voisins sont hydrophobes, mais d'autres sont ionisables (23) et (24) et doivent gêner la fixation de la plage aromatique du BP.

La conséquence doit être une faible valeur de la constante d'association.

L'étude de la fluorescence de nos solutions nous a permis enfin de suivre l'extraction du benzo (a) pyrène de ses sites de fixation sur la BSA. Le Grivès a ajouté des quantités croissantes de chloro-2 éthanol à une solution de complexe BP-BSA, de taux de fixation $\bar{\nu} = 0,59$. Immédiatement après homogénisation de la solution, le spectre d'émission de fluorescence est enregistré. Les spectres obtenus ainsi successivement sont représentés sur la figure 28. La bande attribuée au monomère croît régulièrement en fonction de la quantité de chloro-2 éthanol ajoutée, jusqu'à une valeur maximale. Par contre, la bande large attribuée au polymère décroît, puis disparaît totalement. L'interprétation de l'évolution des spectres est très simple : le polymère inclus dans la BSA est extrait par le chloro-2 éthanol et se retrouve dissous, à l'état monomère, dans la phase eau-chloro-2 éthanol. Ce solvant organique permet donc bien d'ouvrir le passage entre la phase aqueuse et le site hydrophobe interne de la BSA (le "passage" est rigoureusement fermé en l'absence du solvant organique puisque nous pouvons conserver pendant plusieurs mois les solutions de complexe BP-BSA en solution tamponnée sans relarguage de l'hydrocarbure hors de la protéine).

On remarque que l'intensité du pic du polymère, avant extraction, est considérablement plus faible que celle du monomère, après extraction.

Il n'est pas possible de suivre la dissolution de l'espèce monomère fixée sur la BSA, dans la phase chloro-2 éthanol-eau. En effet, les maxima d'émission se situent à des longueurs d'onde trop proches pour qu'on puisse les distinguer.

Après avoir fixé le BP dans la BSA, il est donc possible de l'extraire réversiblement, en utilisant dans les deux sens l'intermédiaire organique. On observe au passage que le spectre de fluorescence du BP après extraction est celui du composé pur ; il n'y a donc pas eu de dégradation chimique.

Au moment de terminer, nous voudrions mettre en lumière un résultat a priori surprenant. Avec un taux de fixation $\bar{\nu}$ égal, ou même inférieur à 1, nous observons un spectre d'absorption ou de fluorescence d'un "polymère". Il est difficile actuellement de définir à partir de combien de molécules associées un tel spectre peut être obtenu;deux suffisent si l'attribution de l'émission de fluorescence du polymère à une émission "excimère" est exacte. Si ce nombre devait être supérieur à $\bar{\nu}$, une seule explication nous apparaîtrait actuellement : c'est qu'il existerait dans chaque solution des protéines chargées uniquement sur le premier site et d'autres renfermant un polymère ; les proportions relatives des deux populations variant avec $\bar{\nu}$. Des expériences nouvelles sont nécessaires pour mettre à l'épreuve cette hypothèse. L'explication pourrait être trouvée dans une inhomogénéité de la protéine commerciale.

CONCLUSION

Nous avons découvert et mis au point un nouveau mode d'introduction du benzo (a) pyrène (BP) dans l'albumine de sérum de boeuf.

L'utilisation d'un intermédiaire organique, le chloro-2 éthanol, permet de fixer jusqu'à dix molécules de benzo (a) pyrène par molécule de protéine.

Les spectres d'absorption et de fluorescence du benzo (a) pyrène suggèrent l'existence de deux sites de fixation, l'un monomère, comportant probablement un résidu tryptophane, l'autre pouvant recevoir plusieurs molécules agglomérées (voir figure 29).

Des expériences en cours au laboratoire portent sur de nouveaux hydrocarbures polycycliques, cancérogènes ou non. Notre méthode d'introduction dans la protéine s'applique encore avec le même succès.

Nous pouvons donc commencer ainsi l'étude comparative de la fixation d'hydrocarbures cancérogènes et non cancérogènes sur les divers sites accepteurs des protéines.

Les techniques utilisées (O.R.D., filtration sur gel, viscosité, ultra - centrifugation, électrophorèse, immunodiffusion, immunoélectrophorèse) n'ont pas permis de mettre en évidence une modification de la structure secondaire ou tertiaire de la protéine liée à l'hydrocarbure. Il pourrait cependant se produire des modifications très localisées de cette structure, limitées à quelques séquences polypeptidiques. Leur détection ne serait possible que s'il existait une propriété structurale des protéines très sensible à une faible perturbation. C'est pour cette raison que nous prévoyons d'étudier la fixation d'hydrocarbures polycycliques sur les protéines de la capside du virus de la mosaïque du tabac. Une légère modification de leur structure tertiaire pourrait empêcher la reconstitution des virions.

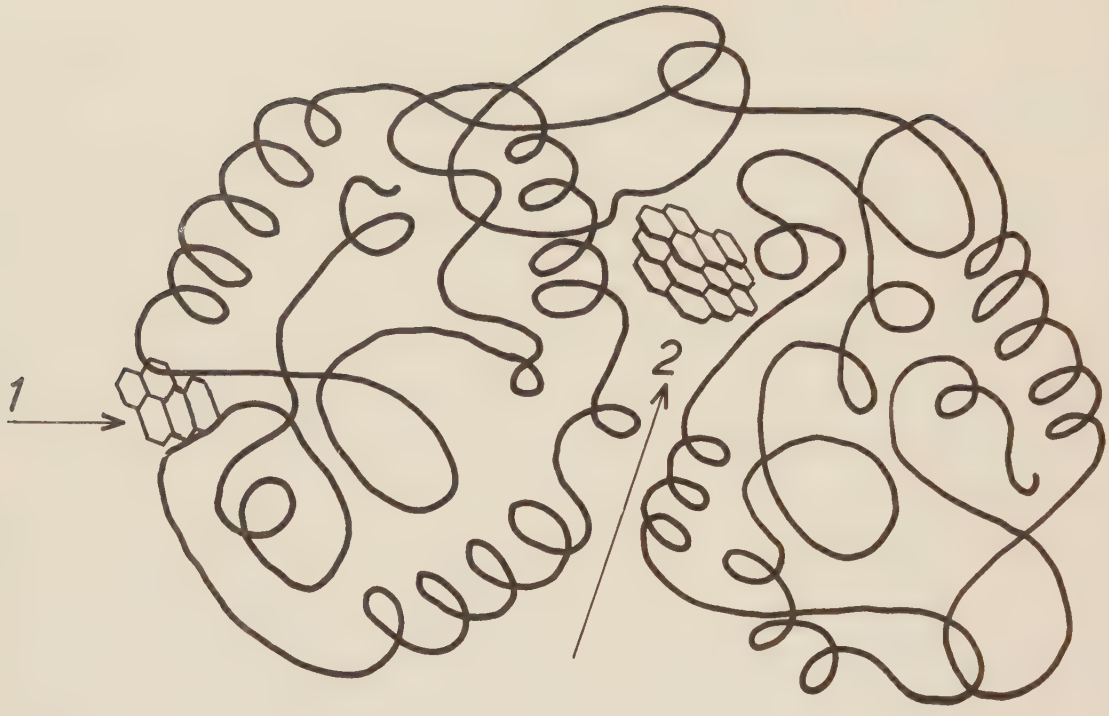


Figure 29 Modèle proposé pour la fixation du BP sur la BSA

(1) Site du monomère (facilement accessible de l'extérieur) ;

(2) Site du polymère (intérieur) ;

APPENDICE

ANALYSE QUANTITATIVE DU BENZO (a) PYRENE TRITIE OU MARQUE AU CARBONE 14 PAR COMPTAGE EN SCINTILLATION LIQUIDE

A - Le dosage d'un hydrocarbure tritié ou marqué au carbone 14

A.1) Préparation pour comptage de la solution initiale de BP dans le toluène.

Un volume V (en général de 50 µl) de la solution initiale de BP dans le toluène est introduit dans un flacon pour comptage en verre de faible bruit de fond (radioactivité inférieure à 20 coups par minute). A ce volume on ajoute 10 ml d'une solution toluénique de scintillateurs - 0,5 g de 2,5-diphényloxazole (PPO) et 0,3 g de P. BIS 2,5-phényloxazolylbenzène (POPOP) pour un litre de toluène -. L'échantillon est refroidi à 4°C et à l'obscurité dans l'enceinte réfrigérée du spectromètre à scintillation. Son activité (voir paragraphe A.2)) est mesurée en comptant le nombre de photons émis en un temps donné (10 mn) (spectromètre à scintillation liquide Intertechnique SL 30.)

Simultanément, un volume V' de la solution de BP dans le toluène est analysée par absorption ultra-violette. La mesure de son absorbance permet la détermination de la concentration totale en hydrocarbure (voir figure 4). Notre étalonnage permettant d'établir la relation entre l'activité et la concentration en hydrocarbure de la solution est alors réalisée.

A.2) Préparation pour comptage de la solution du complexe hydrocarbure aromatique polycyclique-protéine.

Nous venons de voir (A.1)) qu'une simple mesure de la radioactivité par unité de volume d'une solution quelconque de l'hydrocarbure marqué nous permettra de déterminer sa concentration.

Un volume V'' (1 à 5 ml) de la solution aqueuse du complexe BP-BSA est prélevé dans un flacon de comptage. L'eau, qui est un écran pour l'émission β^- du tritium et du carbone 14 est chassée par déshydratation douce en présence d'anhydride phosphorique, puis sous vide d'une pompe à palettes.

La protéine est alors solubilisée dans un solvant organique approprié (0,2 à 1 ml de Soluène). Cette dissolution est facilitée par chauffage (50°C) pendant une heure. Après refroidissement, la solution obtenue est traitée par 10 ml de solution toluénique des scintillateurs (voir paragraphe A.1)). L'échantillon est stabilisé à 4°C et à l'obscurité. Son activité est ensuite mesurée au spectromètre à scintillation liquide.

Soit en résumé :

Prise solution finale

↓

Déshydratation

↓

Mise en solution organique

↓

Traitement par les scintillateurs → Comptage de l'échantillon

B - Le comptage en scintillation liquide . (Intertechnique SL 30).

B.1) Le compteur.

Le schéma de détection du spectromètre à scintillation liquide est le suivant :

Energie β $\xrightarrow{1}$ Energie lumineuse $\xrightarrow{2}$ quantité de courant $\xrightarrow{3}$ impulsion de tension

Les scintillateurs, par l'intermédiaire des molécules de solvant (toluène) excitées, réalisent la transformation de l'énergie β en énergie lumineuse (émission de photons), soit l'opération 1 ; le rendement de l'émission est de quelques photons par Kev d'énergie β : le scintillateur "primaire" (PPO) émet des photons à λ = 3800 Å. Cette émission n'est pas en accord parfait avec la longueur d'onde des tubes photomultiplicateurs, compte tenu du rendement en photons qui doit être optimal. Le scintillateur "secondaire" (POPOP) déplace la longueur d'onde d'émission de 3800 Å à 4200 Å ; l'accord émission/détection se trouve réalisé.

L'échantillon radioactif dont on veut mesurer l'activité est automatiquement positionné dans une chambre limitée par deux réflecteurs et les photocathodes de deux tubes photomultiplicateurs diamétralement opposés, qui réalisent l'opération 2 ; deux adaptateurs permettent la transformation 3 .

Trois voies de comptage sont disponibles : les voies A et B (réglables manuellement) permettent la détermination de l'activité d'un échantillon en simple ou double marquage, et la voie C, préréglée en usine, est réservée au comptage d'échantillons ne contenant qu'un seul isotope. En un temps de comptage choisi, le taux de comptage dans la voie correspondante (1 à 10^6 coups) est affiché numériquement, puis imprimé et perforé sur une machine imprimante TD 33 connectée au compteur. Les opérations de comptage de 200 échantillons sont préprogrammées, en cycle manuel ou automatique.

B.2) Le comptage d'une solution

A la suite du comptage d'un échantillon, la donnée fournie par le spectromètre à scintillation liquide est un nombre de coups brut détectés en un temps donné. Ce résultat est faussé par un certain nombre de paramètres d'erreur, dont l'affaiblissement ou facteur de "Quenching" Q. Ce paramètre est fonction de l'affaiblissement chimique de la solution, de sa coloration ; il peut avoir des causes thermiques ; il dépend également de l'énergie de la particule émise, etc..

Il est donc nécessaire de calculer pour chaque comptage le rendement de comptage correspondant R.

L'activité du radioisotope (exprimée en désintégrations par minute) est donnée en fonction du taux de comptage (en coups par minute) et du rendement de comptage R par la relation :

$$A(d/mn) = \frac{\text{Taux de comptage (coups/mn)}}{R}$$

Pour déterminer R, nous procédons systématiquement à une phase d'étalonnage en mesurant l'activité d'échantillons étalons affaiblis dans des rapports connus qui nous sont fournis par le C.E.A. ; ces échantillons étalons concernent le tritium et le carbone 14. En utilisant la méthode de "l'étalonnage externe", nous avons la possibilité d'exprimer le rendement de comptage R en fonction d'une grandeur physique g proportionnelle au facteur de quenching Q ; cette correction est obtenue au moyen d'une source γ de ^{137}Cs, positionnée dans la chambre de mesure à chaque comptage. g est défini par le rapport :

$$g = \frac{\begin{array}{l}\text{Comptage de la source ext.} \\ \text{+ échantillon (30 s)} \\ \text{Voies A et B commutées} \\ \text{Résultat voie B}\end{array} - \begin{array}{l}\text{Comptage de l'échantillon} \\ \text{seul (30 s)} \\ \text{Voies A et B commutées} \\ \text{Résultat voie B}\end{array}}{\begin{array}{l}\text{Comptage de la source ext.} \\ \text{+ échantillon (30s)} \\ \text{Voies A et B commutées} \\ \text{Résultat voie A}\end{array} - \begin{array}{l}\text{Comptage de l'échantillon} \\ \text{seul (30 s)} \\ \text{Voies A et B commutées} \\ \text{Résultat voie A}\end{array}}$$

La courbe d'étalonnage R = f(g) étant connue, la connaissance de g_x (fournie pour chaque échantillon par le compteur), pour un comptage inconnu x permet d'atteindre son rendement de comptage R_x.

B.2.1.) La solution ne contient qu'un isotope

L'échantillon est compté dans la voie préréglée C. Nous déterminons le taux de comptage dans la voie C (N_C) et le rendement R_C obtenus au moyen d'une courbe d'étalonnage $R_C = f(g)$ établie comme il l'est indiqué ci-dessus. L'activité de l'échantillon est donnée par la relation :

$$A = \frac{N_C}{R_C}$$

B.2.2.) La solution contient deux isotopes (3H et 14C)

Les deux isotopes ont des énergies d'émission voisines. Le tritium, isotope de plus faible énergie, est compté dans la voie A, le carbone 14, d'énergie supérieure dans les voies A et B. Il y a en effet recouvrement des bandes d'émission. Nous retrancherons au taux de comptage du tritium dans la voie A, la contribution du carbone 14, considérant que l'apport du tritium dans la voie B est négligeable.

Au préalable, une phase d'étalonnage permet la connaissance des courbes donnant les rendements en fonction de g :

$R_A^{3H} = f(g)$ rendement du tritium voie A.

$R_A^{14C} = f(g)$ rendement du 14 C voie A.

$R_B^{14C} = f(g)$ rendement du 14C voie B.

La radioactivité en carbone 14 d'un échantillon inconnu sera donnée par la relation :

$$A^{14C} = \frac{\text{Nombre de coups voie B } (N_B)}{R_B^{14C}}$$

celle en tritium par :

$$A^{3H} = \frac{N_A R_B^{14C} - N_B R_A^{14C}}{R_A^{3H} R_B^{14C}}$$

C - Résultats à titre d'exemple (voir tableaux 19 et 20 - figures 30, 31 et 32).

Les courbes d'étalonnage donnant R = f(g) ont été paramétrées par des fonctions de la forme :

$$R = a + be^{-(cg + d)}$$

où g est la grandeur calculée ainsi qu'il l'est défini ci-dessus et $R = \frac{N}{I} \cdot 100$.

La grandeur I désigne l'activité (exprimée en désintégrations par minute) de l'échantillon étalon à l'époque du comptage. Pour le tritium, de période courte (12, 6 ans), nous déterminons I en corrigeant l'activité de l'étalon au moment de sa fabrication par un facteur tenant compte de la période de désactivation du radioélément. Pour le carbone 14 (période 4850 ans), I est constant. N est le nombre de d.p.mn de l'étalon à l'époque de la mesure.

L'information obtenue sur bandes perforées est automatiquement traitée sur notre calculatrice électronique PDP8/I. Sanchez a établi un programme "étalonnage" fournissant les courbes R = f(g) ainsi qu'un document tracé ; un programme "calcul" détermine directement l'activité volumique et par minute de l'échantillon traité.

$$A^{14C}_{(dpm/ml)} = \frac{N_B \cdot 100}{R_B^{14C} \cdot t \cdot V} \qquad A^{3H}_{(dpm/ml)} = \frac{(N_A R_B^{14C} - N_B R_A^{14C})}{R_A^{3H} R_B^{14C}} \cdot \frac{100}{t \cdot V}$$

Le rapport $\bar{\nu}$ du nombre de molécules de BP fixé par molécule de BSA est calculé au moyen des deux relations :

$$\bar{\nu}_{3H} = \frac{A^{3H} M_{BSA} C_{BP}}{C_{BSA} M_{BP} A^{3H}_{BP}} \qquad \text{et} \qquad \bar{\nu}_{14C} = \frac{A^{14C} M_{BSA} C_{BP}}{C_{BSA} M_{BP} A^{14C}_{BP}}$$

TABLEAU 19

ETALONNAGE
3 H

n°	t	N_A	N_B	N_C	A'+ET	B'+ET	A'	B'
1	8							
I = 198875.000								
1	10.00	875025	2583	0	64528	177973	43967	43752
2	10.00	763792	413	0	57570	164169	32170	31842
3	10.00	664661	237	0	55316	160098	25616	25251
4	10.00	568990	230	0	52946	149498	20553	20228
5	10.00	472136	194	0	51896	142153	15402	15089
6	10.00	389562	214	0	52283	138689	11906	11606
7	10.00	255713	202	0	54240	129277	6687	6491
8	10.00	184774	207	0	56321	122318	4256	4116

14 C

1	10							
I = 107000.000								
1	10.00	58045	798920	0	19948	188336	7030	51889
2	10.00	103825	765089	0	31858	186539	12738	50609
3	10.00	125080	700583	0	37410	187342	15406	50406
4	10.00	164644	595098	0	46269	186399	19788	49049
5	10.00	248312	379886	0	62646	177400	27957	46293
6	10.00	212795	467826	0	54931	177613	24681	47948
7	10.00	308835	252017	0	72170	171025	32049	44086
8	10.00	462348	48463	0	88264	159522	36137	38290
9	10.00	543456	3871	0	92025	144653	30641	30635
10	10.00	520655	434	0	89913	127662	23741	23518

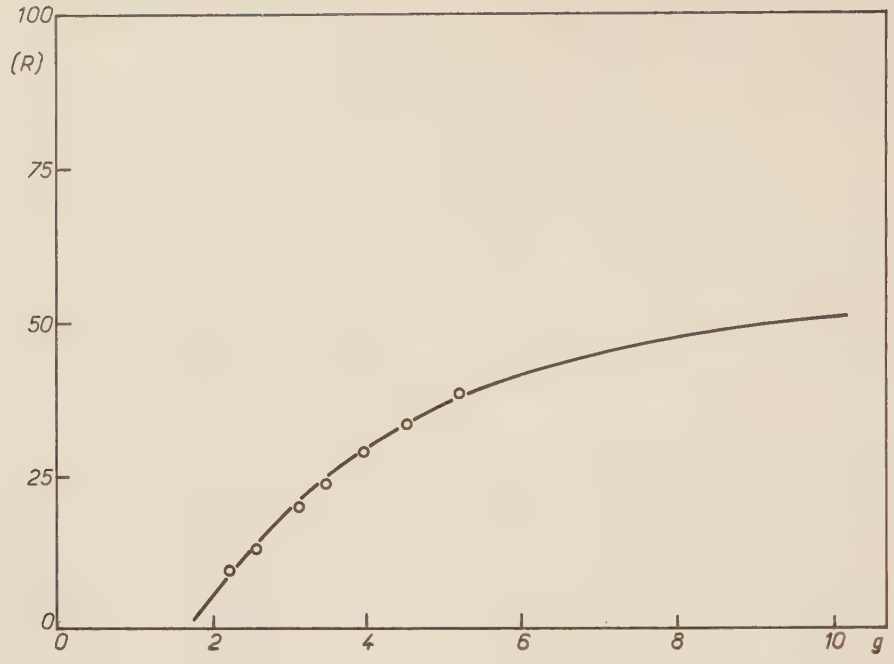


Figure 30 Etalonnage du tritium dans la voie A par comptage en scintillation liquide.
La définition des abcisses et des ordonnées sont données dans le texte

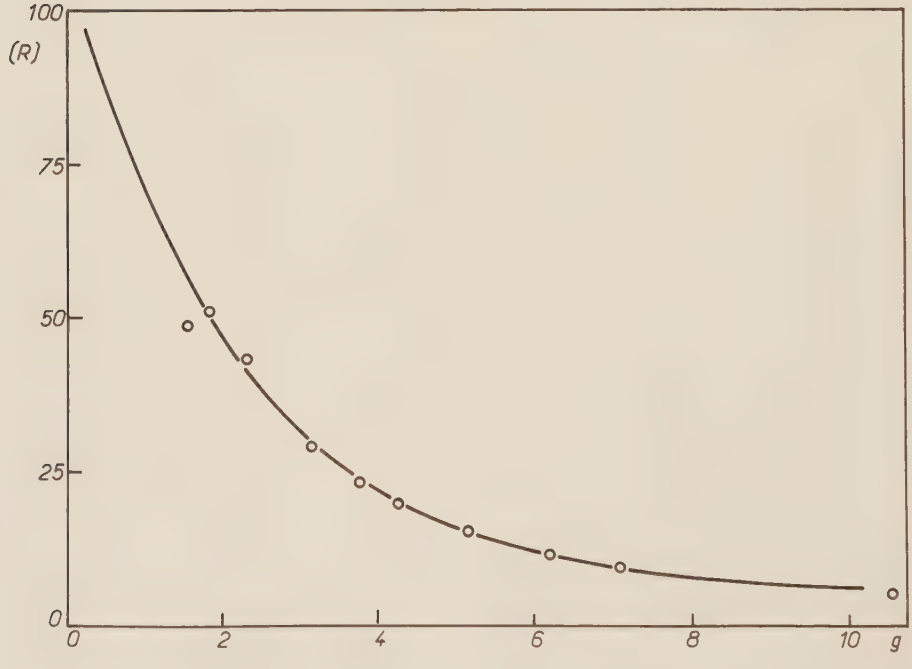


Figure 31 Etalonnage du Carbone 14 dans la voie A par comptage en scintillation liquide

TABLEAU 20

TEST DU BSA + BP DOUBLE MARQUAGE 3H/14C

n°	t	N_A	N_B	N_C	A'+ET	B'+ET	A'	B'
V = 3.5								
1	10.00	62738	99427	0	24646	148786	4264	9235
2	10.00	83472	125323	0	25961	152021	5388	11799
3	10.00	144865	179307	0	30442	161653	9289	17949
4	10.00	106816	160821	0	28023	160699	7101	14979
5	10.00	163372	234894	0	32116	167370	10955	22674
6	10.00	187063	265031	0	33035	165483	12410	25409

TEST DE 50 µl DE SOLUTION M2

1	10.00	365553	600087	0	43454	196947	24111	54089
2	10.00	359534	598155	0	42623	193265	24218	53829

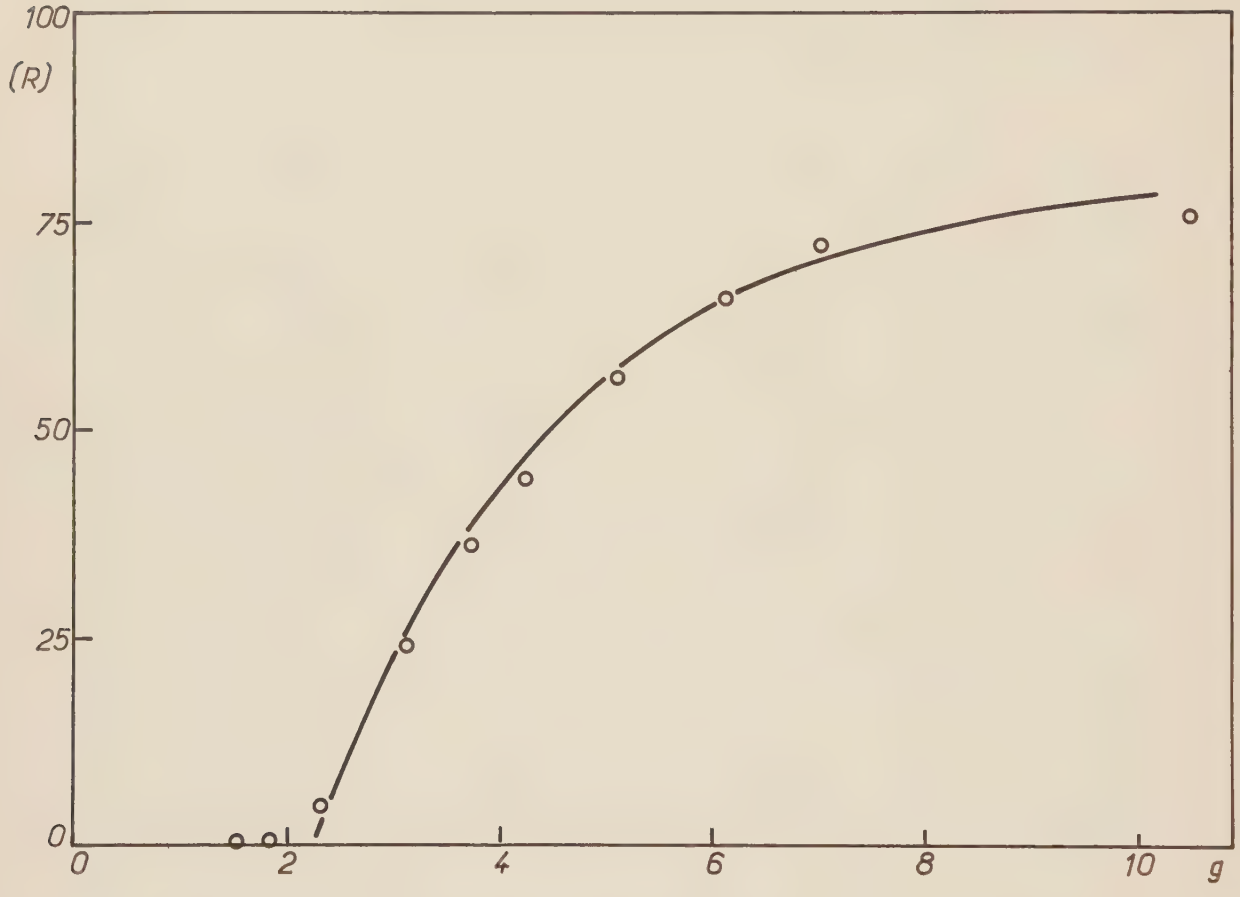


Figure 32 Etalonnage du Carbone 14 dans la voie B par comptage en scintillation liquide.

. A^{3H} et A^{14C} sont les activités volumiques (dpm/ml) de la solution du complexe BP-BSA (exprimées en tritium ou en carbone 14).

. A^{3H}_{BP} et A^{14C}_{BP} sont les activités volumiques (dpm/ml) de la solution initiale de BP dans le toluène (exprimées en tritium ou en carbone 14).

. C_{BSA} est la concentration (mg/ml) de la protéine dans la solution du complexe BP-BSA.

. C_{BP} est la concentration (mg/ml) de l'hydrocarbure dans la solution toluénique initiale.

. M_{BSA} et M_{BP} sont respectivement les masses moléculaires de la BSA et du BP.

BIBLIOGRAPHIE

(1) C.E. WENNER - Advan. Enzymol., (1967), 29, 321.
C.E. WENNER - Proc. Am. Assoc. Cancer Res., (1960), 3, 161.
HULTIN et E. ARRHENIUS - Advan. Enzyme Regulation, (1965), 3, 389.
D.F.H. WALLACH - Curr. Top. Microbiol. Immunol., (1969), 47, 152.
M.M. BURGER et A.R. GOLDBERT - Proc. Natl. Acad. Sci., (Wash), (1967), 57, 359.
M.M. BURGER - Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., (1969), 62, 994.

(2) A.C. ALLISON & MALLUCI - Nature (1964), London 203, 1024.
A.C. ALLISON - Eur. J. Cancer, (1968), 3, 481.
R.F.A. ALTMAN, Archiv. für Geschwulstforschung, (1962), 19, 1.
H.C. PITOT & PERAINO - J. Biol. Chem., (1963), 238, 1910.
H.C. PITOT - Progr. Explt. Tumor. Res., (1965), 7, 158.

(3) HEIDELBERGER - Résultats en cours de publication.

(4) C. HANSCH & T. FUJITA - J. Am. Chem. Soc., (1964), 86, 1616.

(5) R. FRANKE - Mol. Pharmacol., (1969), 5, 640.
R. FRANKE - Acta Biol. Med. Ger., (1970), 25, 789.
R. FRANKE, M. BUCHNER, Acta Biol. Ger., (1972) 29, 17.

(6) J. AVIGNAN - J. Biol. Chem., (1959), 234, 787.
J. AVIGNAN - Cancer Res., (1959), 19, 831.

(7) K. HINSBERG & H. LANG - Medizinische Chemie 3 Aufl. Urban und Schwarzenberg, (1957), München.

(8) R. FRANKE - Acta Biol. Mol. Ger., (1967), 19, 1047.

(9) O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL - J. Biol. Chem., (1951), 193, 265.

(10) P. ZAHLER & E.R. WEIBEL - Biochim. Biophys. Acta, (1970) 219, 320.
D.F. WALLACH & P.H. ZAHLER - Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., (1966), 56, 1552.

(11) P. BOTHOREL & C. LUSSAN - C.R. Acad. Sci., (1968), 266, 2492. (1969), 268, 1118. (1969), 269, 792. (1970), 271, 680.

(12) D.F.H. WALLACH - Fed. Proc., (1968) 21 (6), 1263.
D.F.H. WALLACH & GORDON - "Regulatory functions of biological membranes" (BBA Library n°11) ed. Jarnefelt, Amsterdam : Elsevier 1968.
D. GREEN & J.F. PERDUE - Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., (1965), 55 1295.
B.J. LENARD & S.J. SINGER - Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., (1966), 56 1828.
M. GLASER, H. SIMPKINS, S.J. SINGER, M. SHEETZ & S.I. CHAN, (1970), 65, 721.
S.J. SINGER, G.L. NICOLSON - Science, (1972), 175 , 720.

(13) G.A. BRAUD (Thèse de spécialité en préparation).

(14) Amidoschwarz IOB extra (Naphtalène black B) Serva, Entwicklungslabor. Heidelb

(15) F. CHEN - J. Biol. Chem., (1967), 242, 173.

(16) J. STEINHARDT, J. KRIJN & J.G. LEIDY - Biochem. (1971), 10, 4005.

(17) Techniques de l'Ingénieur - Constantes physicochimiques, 1ère édit. 4-1955, p. K 480-6.

(18) S. BJORNHOLM, E. BARBU & M. MACHEBOEUF - Bull. Sté. Chim. Biol., (1952), 34, (II) 71.

(19) "Optical rotatory dispersion" - Special Techniques, p. 942.

(20) G. SNATZKE - "Optical rotatory dispersion and circular dichroïsm in organic chemistry".

(21) M.T. RYAN - Arch. Biochem. Biophys., (1968), 126, 407.

(22) J.A. REYNOLDS, S. HERBERT, H. POLET & J. STEINARDT - Biochem., (1971), 6, 937.

(23) J.B. SWANEY & I.M. KLOTZ - Biochem., (1970), 9, (13) 1570.

(24) K. SUGAE, B. JIRGENSONS - Tokyo, J. Biochem., (1964), 56, 457.

(25) B. STEVENS - Spectrochimica Acta, (1962), 18, 439.

Vu et approuvé
Bordeaux le
Le Président de l'Université
de Bordeaux I

Centre de Recherche Paul PASCAL
Service Reprographique
Domaine Universitaire
33405 TALENCE